

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA Y TOXICOLÓGICA DEL VENENO
DE *Crotalus pifanorum* (VIPERIDAE) Y EVALUACIÓN DE SU USO
COMO INMUNÓGENO SOBRE LA RESPUESTA POR ANTICUERPOS
CONTRA CO-INMUNÓGENOS Y VENENOS DE OTROS CRÓTALOS
AMERICANOS

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar por el grado y título
de Maestría Académica en Microbiología

ADRIANA ALFARO CHINCHILLA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

Dedicatoria

Dedicado a todas las personas
que en algún momento de mi
vida me han inspirado y
comparten mi pasión por la
naturaleza y la ciencia.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica mediante el proyecto 741-B2-601, titulado “Estudio del efecto inmunosupresor del veneno de la serpiente *Lachesis stenophrys* y su utilidad para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para enfermedades autoinmunes”.

Agradezco profundamente,

Primero a Dios por darme salud, fuerza y herramientas a lo largo de mi vida.

A mi papá por darme apoyo durante mis estudios y a mis amigos por su cariño, interés y complicidad.

A Jairo Gutiérrez por su gran apoyo, amor y siempre estar ahí.

A mi tutor, Guillermo León por su guía y por formar parte de mi proceso de aprendizaje a lo largo de toda la maestría.

A Cecilia Díaz, por su apoyo y orientación.

A Aarón Gómez, por su guía y consejos durante todo este tiempo.

A Álvaro Segura, por ser mi instructor y por su gran disponibilidad.

A Bruno Lomonte y Julián Fernández, por su amable colaboración en la realización de los análisis de espectrometría de masas para el estudio proteómico del veneno de *C. pifanorum*.

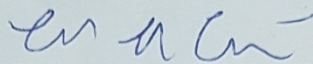
Al equipo de SEDETEC, Mauren Villalta, María Herrera, Andrés Sánchez, Mariángela Vargas y Eduardo Segura que siempre están dispuestos a ayudar.

Al equipo de la planta de producción, control de calidad, serpentario, bioterio y caballeriza por su colaboración en el proceso.

A todo el personal del ICP por su gran cariño y disponibilidad para ayudar.

Gracias.

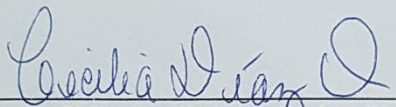
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Análisis clínicos e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.”



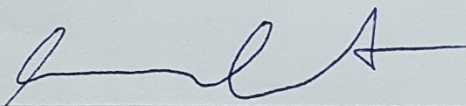
PhD. Carlos Chacón Díaz
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



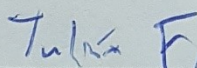
PhD. Guillermo León Montero
Director de Tesis



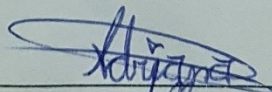
PhD. Cecilia Díaz Oreiro, Ph.D.
Asesora



M.Sc. Aarón Gómez Argüello, M. Sc.
Asesor



PhD. Julián Fernández Ulate
**Representante del Director del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología,
Análisis Clínicos e Inmunología**



Adriana Alfaro Chinchilla
Candidata

TABLA DE CONTENIDOS

	pág
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Tabla de contenidos.....	v
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de cuadros.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Licencia de publicación.....	xiii
 1. ANTECEDENTES.....	01
1.1. Epidemiología del envenenamiento ofídico.....	01
1.2. Componentes principales de los venenos de Vipéridos y sus efectos tóxicos.....	02
1.2.1. Fosfolipasas A ₂ (PLA ₂ s).....	02
1.2.2. Serinoproteasas (SVSPs).....	03
1.2.3. Metaloproteasas (SVMPs).....	04
1.2.4. L-aminoácido oxidasas (LAAOs).....	05
1.2.5. Desintegrinas.....	06
1.2.6. Lectinas tipo C y proteínas tipo-lectinas.....	07
1.2.7. Péptidos natriuréticos e inhibidores de proteasas tipo Kunitz.....	07
1.3. El género <i>Crotalus sp</i> y su clasificación basada en la composición de su veneno.....	08
1.4. Descripción biológica y distribución de <i>Crotalus pifanorum</i>	09
1.5. Manufactura de antivenenos ofídicos.....	11
1.5.1. Producción de veneno.....	12
1.5.2. Producción de plasma hiperinmune.....	13
1.5.3. Producción de antiveneno.....	16
1.6. El problema de las colecciones privadas de serpientes en Costa Rica y el riesgo de accidentes.....	17
 2. JUSTIFICACIÓN.....	19

3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVO GENERAL.....	22
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1. Consideraciones éticas.....	23
6.2. Materiales biológicos.....	23
6.2.1. Veneno.....	23
6.2.2. Animales de experimentación.....	24
6.3. Caracterización proteómica del veneno de <i>C. pifanorum</i>	24
6.3.1. Fraccionamiento del veneno.....	24
6.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	25
6.3.3. Análisis de las bandas.....	26
6.3.4. Abundancia relativa de familias proteicas.....	27
6.4. Actividades tóxicas y enzimáticas de los venenos.....	27
6.4.1. Determinación de la letalidad.....	27
6.4.2. Determinación de la actividad fosfolipasa.....	27
6.4.3. Determinación de la actividad miotóxica.....	28
6.4.4. Determinación de la actividad coagulante.....	28
6.4.5. Determinación de la actividad desfibrinogenante.....	29
6.4.6. Determinación de la actividad proteinasa.....	29
6.4.7. Determinación de la actividad hemorrágica.....	30
6.5. Inhibición del veneno de <i>C. pifanorum</i>	30
6.5.1. Inhibición de PLA ₂ s con bromuro de <i>p</i> -bromofenacilo (<i>p</i> -BPB).....	31
6.5.2. Inhibición de SVSPs con fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF).....	31
6.5.3. Inhibición de SVMPS con Batimastat.....	31
6.6. Producción de antivenenos.....	32

6.7.	Capacidad neutralizante de los antivenenos.....	32
6.8.	Análisis de datos y estadística.....	33
7.	RESULTADOS.....	35
7.1.	Caracterización de la composición proteómica del veneno de <i>C. pifanorum</i>	35
7.2.	Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de <i>C. pifanorum</i>	40
7.3.	Inmunogenicidad del veneno de <i>C. pifanorum</i>	41
7.4.	Efecto del veneno <i>C. pifanorum</i> sobre la respuesta contra co-inmunógenos.....	42
7.5.	Efecto del veneno <i>C. pifanorum</i> sobre la paraespecificidad del PoliVal-ICP.....	44
8.	DISCUSIÓN.....	47
8.1.	Caracterización de la composición proteómica del veneno de <i>C. pifanorum</i>	47
8.2.	Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de <i>C. pifanorum</i>	47
8.3.	Neutralización de las actividades tóxicas del veneno de <i>C. pifanorum</i>	49
8.4.	Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de los co-inmunógenos..	49
8.5.	Neutralización cruzada de venenos heterólogos de cascabeles neurotóxicas.....	50
9.	CONCLUSIONES.....	52
10.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Resumen

En Costa Rica se produce un antiveneno poliespecífico (PoliVal-ICP) usando como inmunógenos los venenos de las serpientes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenophrys*. Este antiveneno es capaz de neutralizar a la mayoría de los venenos de las serpientes centroamericanas de la familia Viperidae, pero es incapaz de neutralizar el veneno de serpientes exóticas que se mantienen en colecciones privadas. Tal es el caso de *Crotalus pifanorum*, una cascabel originaria de Venezuela, que posee un veneno neurotóxico, y que ya ha producido envenenamientos en Costa Rica. Para reducir el riesgo asociado al accidente por mordedura de estas serpientes, se propuso ampliar el espectro de paraespecificidad del PoliVal-ICP para incluir venenos de cascabeles neurotóxicas. Mediante un estudio proteómico se determinó que el veneno de *C. pifanorum* está compuesto principalmente por PLA₂s, SVSPs y BPPs. El veneno de *C. pifanorum* presenta actividad letal dada principalmente por sus PLA₂s y SVSPs, actividades PLA₂ y miotóxica dada por sus PLA₂s, actividades coagulante y desfibrinogenante dada por sus SVSPs. Por otra parte, no presenta actividades proteolítica ni hemorrágica debido a su bajo contenido de SVMPS. Al incluir el veneno de *C. pifanorum* en el grupo de inmunógenos, el antiveneno mejoró su capacidad para neutralizar al veneno de *C. simus*, sin afectar su capacidad para neutralizar los venenos de *B. asper* y *L. stenophrys*. Además, amplió su paraespecificidad para incluir al veneno de *C. scutulatus* y no afectó la capacidad para neutralizar a los venenos de *C. horridus* y *C. d. terrificus*. En conclusión, el uso del veneno de *C. pifanorum* como inmunógeno en la producción de PoliVal-ICP es una alternativa adecuada para ampliar el espectro de cobertura de este antiveneno para incluir venenos de cascabeles neurotóxicas.

Palabras clave: Antiveneno, *C. pifanorum*, serpientes cascabeles neurotóxicas.

Abstract

A polyspecific antivenom (PoliVal-ICP) is produced in Costa Rica using *Bothrops asper*, *Crotalus simus* and *Lachesis stenophrys* snake venoms as immunogens. This antivenom is able to neutralize most of Central American pit viper snakes venoms but is unable to neutralize the venom of exotic snakes that are kept in private collections. Such is the case of *Crotalus pifanorum*, a rattlesnake native to Venezuela, which has a neurotoxic venom, and that has already produced envenomings in Costa Rica. To reduce the risk associated with the bite accident of these snakes, it was proposed to broaden the spectrum of para-specificity of the PoliVal-ICP to include neurotoxic rattlesnakes. A proteomic study determined that *C. pifanorum* venom is mainly composed of PLA₂s, SVSPs and BPPs. The *C. pifanorum* venom shows lethal activity mainly due to its PLA₂s and SVSPs, PLA₂ and myotoxic activities given by its PLA₂s, coagulant and defibrinogenic activities given by its SVSPs. On the other hand, does not present proteolytic or hemorrhagic activities due to its low content of SVMPS. By including *C. pifanorum* venom in the immunogen group, the antivenom improved its ability to neutralize *C. simus* venom, without affecting its ability to neutralize *B. asper* and *L. stenophrys* venoms. In addition, it expanded its para-specificity to include *C. scutulatus* venom and did not affect the ability to neutralize *C. horridus* and *C. d. terrificus* venoms. In conclusion, the use of *C. pifanorum* venom as an immunogen in the production of PoliVal-ICP is a suitable alternative to broaden the coverage spectrum of this antivenom to include neurotoxic rattlesnakes.

Key words: Antivenom, *C. pifanorum*, neurotoxic rattlesnakes.

Lista de cuadros

Cuadro 1: Identificación por espectrometría de masas de las bandas obtenidas por SDS-PAGE o muestras líquidas de las fracciones colectadas por HPLC del veneno de *C. pifanorum*.

Cuadro 2: Actividades enzimáticas y tóxicas del veneno de *C. pifanorum*.

Cuadro 3: Neutralización* de las actividades del veneno de *C. pifanorum*.

Cuadro 4: Actividades enzimáticas y tóxicas de los co-inmunógenos homólogos.

Cuadro 5: Neutralización* de las actividades de los co-inmunógenos homólogos.

Cuadro 6: Actividades enzimáticas y tóxicas de los venenos heterólogos.

Cuadro 7: Neutralización* de las actividades de venenos heterólogos.

Lista de figuras

Figura 1: Ejemplar adulto de *Crotalus pifanorum* mantenido en cautiverio en el Serpentario del ICP.

Figura 2: Cromatograma del veneno de *C. pifanorum* fraccionado por RP-HPLC.

Figura 3: SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas del veneno de *C. pifanorum*.

Figura 4: Masa intacta de la fracción F7a por analizador electrospray.

Figura 5: Abundancia relativa de las principales familias proteicas del veneno de *C. pifanorum* identificadas por espectrometría de masas a partir de bandas de proteínas digeridas en gel.

Lista de abreviaturas

CICUA: Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales

CRISPs: Proteínas secretoras ricas en cisteínas, (siglas en inglés).

DCM: Dosis coagulante mínima

DDM: Dosis desfibrinogenante mínima

DE₅₀: Dosis eficaz media

DL₅₀: Dosis letal media

DMM: Dosis mitotóxica mínima

i.d.: Intradérmica

i.m.: Intramuscular

i.p.: Intraperitoneal

i.v.: Intravenosa

ICP: Instituto Clodomiro Picado

LAAOs: L-aminoácido oxidasas

MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz, (siglas en inglés).

p-BPB: Bromuro de *para*-bromofenacilo.

PBS: Buffer salino de fosfatos, (siglas en inglés).

PLA₂s: Fosfolipasas de tipo A₂

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, (siglas en inglés).

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico, (siglas en inglés).

SVMPs: Metaloproteasas de veneno de serpiente, (siglas en inglés).

SVSPs: Serinoproteasas de veneno de serpiente, (siglas en inglés).

TFA: Ácido trifluoroacético, (siglas en inglés).

TOF: Tiempo de vuelo, (siglas en inglés).

WHO: Organización mundial de la salud, (siglas en inglés).



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Adriana Alfaro Chinchilla, con cédula de identidad 206450114, en mi condición de autor del TFG titulado Caracterización proteómica y toxicológica del veneno de *Crotalus pitambarum* (Viperidae) y evaluación de su uso como inmunógeno sobre la respuesta por anticuerpos contra co-inmunógenos y venenos de otros crocotas americanos. Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Adriana Alfaro Chinchilla

Número de Carné: 058005 Número de cédula: 206450114

Correo Electrónico: adalchi88@yahoo.es

Fecha: 03/12/19 Número de teléfono: 8580-6322

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Gillermo León Montero

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. ANTECEDENTES

1.1. Epidemiología del envenenamiento ofídico

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública que causa gran número de muertes y secuelas, tanto físicas como psicológicas, en millones de personas alrededor del mundo (Kasturiratne *et al.*, 2008). Se estima que anualmente ocurren 5.4 millones de accidentes ofídicos en todo el planeta. De estos, entre 1.8 y 2.7 millones cursan con envenenamiento, produciendo hasta 137.000 muertes y aproximadamente 400.000 discapacidades permanentes, incluyendo amputaciones (WHO, 2017).

Se estima que en Norteamérica ocurren alrededor de 12.000 envenenamientos ofídicos al año, de los cuales 8.000 ocurren en Estados Unidos y Canadá (Kasturiratne *et al.*, 2008), y 4.000 en México (Chippaux, 2017). En Suramérica la incidencia se estima en alrededor de 45.000 casos que se distribuyen de la siguiente manera: 29.000 en Brasil, 7.000 en Venezuela, 3.000 en Colombia, 1.600 en Ecuador, 1.500 en Perú, 1.000 en Bolivia, 500 en Paraguay, 300 en las Guayanas, 270 en Argentina y 60 en Uruguay (Gutiérrez, 2011).

En la región Centroamericana, se ha estimado que cada año ocurren alrededor de 5.000 accidentes ofídicos. De estos, cerca de 900 accidentes ocurren en Guatemala y entre 600 y 700 casos son reportados en países como Honduras, Nicaragua y Costa Rica. Panamá presenta la mayor incidencia en la región, pudiendo llegar hasta los 1.900 casos por año. En contraste, países como Belice y El Salvador registran incidencias menores a los 300 casos anuales (Chippaux, 2017).

1.2. Componentes principales de los venenos de Vipéridos y sus efectos tóxicos

Los componentes de los venenos de las serpientes de la familia Viperidae tienen la capacidad de inducir diferentes efectos tóxicos que, en conjunto, producen cuadros clínicos de envenenamiento caracterizados por daños locales tempranos y prominentes, como edema, formación de ampollas, dolor, hemorragia y necrosis local; seguidos de alteraciones sistémicas como sangrado, coagulopatías, choque cardiovascular, insuficiencia renal aguda y eventualmente la muerte (Loría *et al.*, 2003).

Los análisis proteómicos de los venenos de Vipéridos, han revelado que estos se encuentran compuestos por distintas familias de proteínas; principalmente por fosfolipasas A₂ (PLA₂s), serinoproteasas (SVSPs) y metaloproteasas (SVMs). Otras familias de proteínas como las L-aminoácido oxidasas (LAAOs), las desintegrinas, las proteínas tipo lectinas y lectinas tipo C, las proteínas secretoras ricas en cisteínas (CRISPs), los péptidos natriuréticos y los inhibidores de proteasas de tipo Kunitz, son componentes que se encuentran en menor abundancia (León *et al.*, 2011; Angulo *et al.*, 2014).

1.2.1. Fosfolipasas A₂ (PLA₂s)

Las PLA₂s son proteínas de bajo peso molecular (14-18 kDa), que se clasifican en dos clases: la clase I, que es la que está presente en venenos de elápidos; y la clase II, que es la que está presente en venenos de vipéridos, en concentraciones entre el 5% y el 45% (Magro *et al.*, 2004). Las PLA₂s que presentan actividad enzimática requieren cantidades micromolares de calcio. La unión de este cofactor está íntimamente ligada al aspartato ubicado en la posición 49 en la estructura primaria de estas enzimas (Magro *et al.*, 2004).

Las PLA₂s enzimáticamente activas (aspartato 49) afectan directamente la integridad de diferentes tipos celulares, al hidrolizar los fosfolípidos de sus membranas plasmáticas. Esto origina un influjo de calcio hacia el citosol que daña a las mitocondrias y pone en marcha una serie de eventos degenerativos que culminan con lesiones celulares irreversibles (Gutiérrez, 2002).

En venenos de vipéridos también es posible encontrar otras PLA₂s en las que la posición 49 no es ocupada por un aspartato, sino por una lisina. Esto afecta la capacidad de la toxina para acoplar calcio y por lo tanto estas toxinas no son enzimáticamente activas. Sin embargo, al igual que las toxinas con actividad enzimática (aspartato 49) las PLA₂s con lisina 49 también pueden presentar actividad citotóxica; lo que demuestra que la hidrólisis de fosfolípidos no es indispensable para que las PLA₂s puedan producir daño en las membranas celulares (Sardar *et al.*, 2014; Sunagar *et al.*, 2015).

La toxicidad de las PLA₂s se manifiesta clínicamente de diferentes formas, variando de una especie de serpiente a otra. En general, las manifestaciones clínicas producidas por las PLA₂s incluyen mionecrosis local y sistémica, hipotensión, coagulopatía, inhibición de la agregación plaquetaria (Doley *et al.*, 2009) y neuropatía. Esta última manifestación clínica ocurre por la capacidad de algunas PLA₂s para inhibir la liberación de acetilcolina y bloquear la transmisión neuromuscular a nivel pre-sináptico, generando la parálisis de nervios y músculos de la respiración (Gutiérrez, 2002; Sardar *et al.*, 2014).

1.2.2. Serinoproteasas (SVSPs)

Las SVSPs constituyen el 10-30% del contenido de proteína en los venenos de vipéridos (León *et al.*, 2011). Estas toxinas poseen masas moleculares de 25-70 kDa y se

caracterizan por poseer una tríada catalítica conservada (Ser, His y Asp), y por la presencia de abundantes puentes disulfuro. La mayoría, muestran un grado de glicosilación variable, la cual es una característica estructural que influye en su inmunogenicidad (León *et al.*, 2011).

Algunas SVSPs de vipéridos son similares a la trombina y contribuyen a la desfibrinación mediante la liberación de fibrinopéptidos A o B del fibrinógeno. Esto causa la formación de microcoágulos que se degradan fácilmente por el sistema fibrinolítico. Otras SVSPs son enzimas tipo calicreína y contribuyen a la hipotensión mediante la generación de bradiquinina (Serrano y Maroun, 2005; León *et al.*, 2011). También existen SVSPs que funcionan como activadores de plasminógeno y otras que al interactuar con los receptores de trombina en las plaquetas pueden inducir agregación plaquetaria (Phillips *et al.*, 2009).

1.2.3. Metaloproteasas (SVMPs)

Las SVMPs constituyen el 30-60% del contenido total de proteína de los venenos de vipéridos (Markland y Swenson, 2013). Estas toxinas son miembros de la superfamilia de las metzincinas, las cuales contienen en su sitio activo un motivo de unión al zinc que se caracteriza por la secuencia HEXXHXXGXXH (Markland y Swenson, 2013).

Estructuralmente, las SVMPs se clasifican tres grupos: 1) P-I, las cuales poseen masa molecular de alrededor de 25 kDa y solo poseen un dominio catalítico que corresponde al dominio metaloproteinasa dependiente de Zn^{2+} ; 2) P-II, las cuales presentan masas de 30-50 kDa y tienen un dominio desintegrina además del dominio catalítico. Dependiendo de las modificaciones postraduccionales en su dominio desintegrina, las PII

se dividen en 5 subclases (P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId y P-IIe); y 3) P-III, caracterizadas por masas moleculares de 50-70 kDa y una estructura que en adición a los dominios metaloproteínasa y tipo desintegrina, presentan un dominio rico en cisteína (Florea *et al.*, 2016).

Las SVMPs poseen la capacidad de degradar la laminina y el colágeno tipo IV de la matriz extracelular de la red capilar, favoreciendo así la formación de lesiones hemorrágicas. Las SVMPs del tipo P-I son las principales responsables de la hemorragia local, mientras que las del tipo P-II son las principales responsables de la hemorragia sistémica, que eventualmente podría llevar a choque hipovolémico y muerte (Gutiérrez *et al.*, 2005).

Las SVMPs también producen dermonecrosis (León *et al.*, 1999). Además, debido a su actividad fibrinogenolítica y a su capacidad para activar al factor X y a la protrombina, estas toxinas pueden producir coagulopatías que potencian la severidad de sus efectos hemorrágicos (Moura da Silva *et al.*, 2009). Finalmente, los problemas de perfusión producidos por las SVMPs pueden llevar a isquemia y necrosis del tejido distal en relación con el punto de inyección del veneno (Gutiérrez, 2002; Florea *et al.*, 2016).

1.2.4. L-aminoácido oxidasas (LAAOs)

Las LAAOs constituyen el 1-30% de los componentes proteicos de los venenos de vipéridos. Generalmente se encuentran como glicoproteínas homodiméricas con masas moleculares de 110-150 kDa, aunque también se han aislado algunas monoméricas (León *et al.*, 2011). Son flavoenzimas enantioselectivas que catalizan la desaminación oxidativa estereoespecífica de una amplia gama de L-aminoácidos para formar α -cetoácidos,

amoníaco y peróxido de hidrógeno. Las L-aminoácido oxidasas, poseen la capacidad para producir apoptosis, inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición del crecimiento microbiano y formación de edema (Chunmei *et al*, 2012).

1.2.5. Desintegrinas

Las desintegrinas constituyen entre el 2-10% del veneno total de vipéridos y son ricas en enlaces disulfuro (Calvete, 2013). Se pueden aislar como monómeros, dímeros o fragmentos con dominios adicionales (el dominio rico en cisteína de SVMPS). Las desintegrinas poseen actividad inhibitoria de integrinas con un apropiado apareamiento entre cisteínas, el cual determina la conformación de un loop que alberga un tripéptido activo (Calvete, 2013).

Las desintegrinas se dividen en cinco grupos: 1) Cortas, compuestas de 40-50 residuos y cuatro enlaces disulfuro; 2) Medianas, que contienen 70 aminoácidos y seis enlaces disulfuro; 3) Largas, compuestas por 84 residuos y siete enlaces disulfuro; 4) Tipo P-III, que son proteínas modulares que contienen un dominio similar a desintegrina N-terminal y 16 residuos de cisteína implicados en la formación de ocho enlaces disulfuro; y 5) desintegrinas diméricas, que son homodímeros o heterodímeros que contienen subunidades de 67 residuos con 10 cisteínas (León *et al.*, 2011).

El papel de las desintegrinas en el envenenamiento aún no es conocido. Sin embargo, se ha demostrado que estas toxinas pueden unirse a las integrinas en las membranas celulares, ejerciendo así una diversidad de efectos dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, las desintegrinas que contienen la secuencia Arg-Gly-Asp, se unen a la

integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de las plaquetas, causando inhibición de la agregación plaquetaria y afectando el proceso hemostático (Gutiérrez, 2002; León *et al.*, 2011).

1.2.6. Lectinas tipo C y proteínas tipo-lectinas

Las proteínas tipo lectina, son proteínas multidominio no enzimáticas, dependientes de calcio, que contienen una o más copias de regiones altamente conservadas. Generalmente poseen estructuras heterodiméricas (subunidades alfa y beta) que a menudo se oligomerizan para formar moléculas más grandes (Ogawa *et al.*, 2005).

Las lectinas tipo C, poseen una masa molecular de aproximadamente 30 kDa, y su abundancia relativa en venenos de vipéridos se varía entre el 0.1% y 24% (Tan *et al.*, 1990). Basado en la especificidad de reconocimiento al ligando se pueden clasificar en 3 tipos: 1) Tipo I, que incluye a las proteínas de unión al factor coagulante IX/X; 2) Tipo II, que incluye a las proteínas de unión al factor coagulante IX; y 3) Tipo III, que incluye a las proteínas de unión al factor coagulante X (Ogawa *et al.*, 2005).

Las proteínas tipo lectina y lectinas tipo C presentan actividades como la inducción/inhibición de la agregación plaquetaria, la inducción de la aglutinación plaquetaria y la inhibición de la coagulación a través de su unión a los factores de la coagulación (Ogawa *et al.*, 2005; León *et al.*, 2011).

1.2.7. Péptidos natriuréticos e inhibidores de proteasas tipo Kunitz

Los péptidos natriuréticos son potentes toxinas hipotensoras, que en serpientes han evolucionado en péptidos potenciadores de bradiquinina o péptidos inhibidores de

metaloproteasas que se liberan después de la traducción (Fry *et al.*, 2009). Por su parte, los inhibidores de proteasas tipo Kunitz inhiben a la plasmina y la trombina, mientras que otras tienen actividad neurotóxica dirigida a los canales de Ca^{2+} de tipo L (Fry *et al.*, 2009).

1.3. El género *Crotalus* sp y su clasificación basada en la composición de su veneno

El género *Crotalus* está distribuido desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina (Campbell y Lamar, 1989) y está compuesto por 43 especies de serpientes comúnmente conocidas como cascabeles (Wallach *et al.*, 2014). Algunas de ellas son consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre las serpientes de mayor importancia médica en América; por ejemplo *C. adamanteus*, *C. atrox*, *C. durissus*, *C. horridus*, *C. oreganus*, *C. simus*, *C. scutulatus*, *C. totonacus* y *C. viridis* (WHO, 2016).

En 2008, Mackessy propuso una clasificación simplificada para serpientes del género *Crotalus* según su tipo de veneno. En esta clasificación, los venenos del tipo I están compuestos principalmente por SVMPs, por lo que son principalmente hemorrágicos y de toxicidad relativamente baja (Mackessy, 2008). Las serpientes que corresponden a este tipo se distribuyen mayoritariamente en Norteamérica. Ejemplos de cascabeles con venenos del tipo I son: *C. atrox*, *C. simus* y *C. viridis* (Mackessy, 2008).

Por otro lado, los venenos del tipo II están compuestos principalmente por PLA_2 , por lo que son neurotóxicos y de toxicidad relativamente alta (Mackessy, 2008). Las serpientes que corresponden al tipo II se distribuyen mayoritariamente en Centroamérica y Sudamérica. Ejemplos de cascabeles con venenos del tipo II son: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. scutulatus* y *C. tigris* (Mackessy, 2008).

La clasificación propuesta por Mackessy encuentra sus limitaciones en cascabeles que muestran fenotipos intermedios entre los tipos I y II, los cuales son compuestos tanto por SVMPs como por PLA₂s neurotóxicas, y generan cuadros clínicos caracterizados por efectos locales como edema, hemorragia y necrosis; junto con efectos sistémicos como neurotoxicidad, miotoxicidad, coagulopatía y fallo renal agudo (Yoshida-Kanashiro *et al.*, 2003). Ejemplos de estas serpientes son: *C. d. ruruima*, *C. d. cumanensis* y *C. vegrandis*.

Otra de las limitaciones de la clasificación de Mackessy es que no contempla la variabilidad intraespecífica de los venenos de serpiente que se genera por diferencias en el origen geográfico o las variaciones ontogénicas de los ejemplares (Massey *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha descrito que ejemplares juveniles de *C. simus* presentan venenos que corresponden mejor con el tipo II, mientras que los adultos presentan venenos del tipo I (Calvete *et al.*, 2010). Se ha hipotetizado que el cambio ontogenético de tipo II a tipo I en *C. simus* es modulado después de la transcripción, por cambios en la concentración de miARN, que son dependientes de la edad.

1.4. Descripción biológica y distribución de *Crotalus pifanorum*

Los ejemplares de *C. pifanorum* (Sandner-Montilla, 1980), son de tamaño pequeño aproximadamente 68 cm, presentan cuerpo robusto con una coloración básica desde el gris o marrón oscuro hasta el negro. Su cabeza es corta y acorazonada con presencia de pupilas verticales (Sandner-Montilla, 1985) (figura 1).

Su sistema principal presenta entre 17 y 38 marcas hexagonales bien determinadas, nítidas, bordeadas por puntitos blancos que en el dorso medio se transforman en pirámides

estableciendo un contraste en la región dorso-nucal. La cara ventral es de color gris brillante claro, acompañado de manchas o semifranjas color marrón oscuro brillantes (figura 1) (Sandner-Montilla, 1985).

Las serpientes *C. pifanorum* son endémicas del Estado Guárico de Venezuela. Se distribuyen geográficamente desde la zona de Parmana hasta el Aguaró, habitan regiones con terreno inclinado por colinas de 30-40 metros de altura que presentan árboles frondosos (Sandner-Montilla, 1985; Pérez, 2013).



Figura 1. Ejemplar adulto de *Crotalus pifanorum* mantenido en cautiverio en el Serpentario del ICP.

1.5. Manufactura de antivenenos ofídicos

En la actualidad, el único medicamento validado para el tratamiento de los envenenamientos por mordedura de serpiente es la administración parenteral de antivenenos ofídicos (WHO, 2016). Los antivenenos son formulaciones de inmunoglobulinas (o sus fragmentos Fab o F(ab')₂) purificadas a partir del plasma de animales que han sido inmunizados con venenos de serpiente (WHO, 2016). Estas inmunoglobulinas tienen la capacidad de reconocer a los componentes del veneno y neutralizar su capacidad para producir toxicidad.

Debido a que el accidente ofídico generalmente es sufrido por personas de escasos recursos económicos, que viven en comunidades marginales de países pobres, la producción de antivenenos no representan una actividad atractiva para la industria farmacéutica. Esto limita la cantidad y calidad de antivenenos disponibles en el mercado y contribuye al actual desabastecimiento global de estos medicamentos. Debido a esta problemática, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó, en el año 2017, al accidente ofídico dentro de la lista prioritaria de enfermedades tropicales desatendidas (Talha Burki, 2018).

Al igual que cualquier otro medicamento, los antivenenos deben cumplir características de pureza, identidad, eficacia y seguridad, según lo indicado por las Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica (WHO, 2010). Por eso, cada etapa de la producción de antivenenos debe ser cuidadosamente diseñada y controlada, de modo que pueda garantizarse que todos los lotes liberados cumplen todas las especificaciones.

La producción de antivenenos antiofídicos comprende una gran cantidad de actividades que incluyen la producción de agua inyectable, el manejo de cuartos limpios, la sanitización de las líneas de equipamiento y el control de calidad de los productos parciales y finales. Sin embargo, la ilustración de la lógica central del proceso normalmente se limita a: 1) producción de veneno, 2) producción de plasma hiperinmune, y 3) producción de antiveneno (León *et al.*, 2014).

1.5.1. Producción de veneno

Para la producción de venenos debe conformarse una colección de serpientes, debidamente identificadas, que pueden provenir de la naturaleza o haber sido criadas en cautiverio (Corrales *et al.*, 2014). Estas serpientes deben estar sometidas a cuidado veterinario constante que verifique su estado nutricional y de salud general. Normalmente, las especies incluidas en estas colecciones corresponden a las señaladas por las autoridades de salud como las de mayor importancia médica en la región (WHO, 2016).

El primer paso en la producción de antivenenos es la producción de venenos de referencia. La característica principal de estos venenos es la representatividad de los venenos que podrían encontrarse en los ejemplares silvestres que habitan en la región donde se pretende usar el antiveneno. Para lograr esta representatividad consistentemente en todos los lotes de veneno, debe usarse la mayor cantidad de ejemplares posible y hacer todos los esfuerzos por reducir los efectos de la variabilidad introducida por el origen geográfico, la ontogenia y el sexo de los ejemplares usados (WHO, 2016).

Para la extracción de veneno, las serpientes son adormecidas mediante la inhalación de CO₂. Posteriormente, el veneno es extraído por estimulación mecánica de las glándulas de veneno y recolectado en viales de vidrio o algún otro material que garantice la no adsorción de los componentes del veneno (Goebel-Stengel *et al.*, 2011). Una vez extraído, el veneno es congelado a -20°C para prevenir su auto-degradación (Sousa *et al.*, 2001).

Los venenos de referencia son usados durante varios años para inmunizar los caballos empleados como fuente de inmunoglobulinas y para evaluar la eficacia de los antivenenos producidos. Para lograr que los venenos mantengan su antigenicidad y toxicidad a lo largo de su vida útil, estos son estabilizados por desecación o liofilización (Meier *et al.*, 1991) y su calidad es verificada mediante la evaluación de sus actividades tóxicas y enzimáticas (WHO, 2016).

1.5.2. Producción de plasma hiperinmune

Normalmente, los animales seleccionados como fuente de inmunoglobulinas para la producción de antivenenos son los caballos, aunque también podrían utilizarse ovejas, camellos y gallinas (WHO, 2016). La inmunización se realiza mediante la administración repetida de pequeñas dosis de veneno mezcladas con adyuvantes, o simplemente disueltas en solución salina (León *et al.*, 2011).

Los adyuvantes son sustancias potenciadoras de la respuesta inmune; por ejemplo, emulsiones de aceite mineral (Valverde *et al.*, 2017) o cristales de sales minerales (Olmedo *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a que los adyuvantes también producen daño local moderado, su uso es normalmente limitado a las etapas más tempranas del proceso de

inmunización. Habitualmente las dosis de refuerzo se aplican sin adyuvante (León *et al.*, 2011).

Si durante la inmunización se utiliza solo un veneno de serpiente, el plasma hiperinmune resultante será monoespecífico. En cambio, si la inmunización se realiza empleando varios venenos de diferentes especies de serpientes, el plasma hiperinmune resultante será poliespecífico. Alternativamente, pueden producirse antivenenos poliespecíficos mezclando varios plasmas hiperinmunes monoespecíficos (León *et al.*, 2018).

En la producción de plasma hiperinmune poliespecífico es importante considerar que algunos venenos afectan la respuesta por anticuerpos inducida por otros venenos usados como co-inmunógenos (Arroyo *et al.*, 2015; 2017). Estas interferencias son normalmente manejadas mediante la inyección de los diferentes venenos en los mismos animales, pero en diferentes momentos (León *et al.*, 2011).

Sin importar si el plasma hiperinmune es monoespecífico o poliespecífico, este tendrá la capacidad de neutralizar no solo a los venenos empleados como inmunógenos (venenos homólogos), sino que también podrán neutralizar de forma cruzada a algunos venenos que, aunque no fueran usados como inmunógenos (venenos heterólogos), son antígenicamente similares a los que sí fueron usados (WHO, 2016).

Por ejemplo, el plasma hiperinmune producido por el Instituto Clodomiro Picado empleando los venenos de *Bothrops asper*, *C. simus* y *L. stenophrys* como inmunógenos, hace posible que el antiveneno PoliVal-ICP (producido a partir de ese plasma) tenga la capacidad para neutralizar además de a sus venenos homólogos, a algunos venenos heterólogos costarricenses como los de *Agkistrodon howardgloydi*, *Atropoides picadoi*,

Bothriechis lateralis, *Bothriechis supraciliaris*, *Cerrophidion sasai*, *Lachesis melanocephala*, *Porthidium nasutum* y *Porthidium ophryomegas* (Solano *et al.*, 2018); y a algunos venenos heterólogos de serpientes de otras regiones como *Bothrops lanceolatus*, *Bothrops caribbaeus*, *Bothrops colombiensis*, *Bothrops atrox*, *Crotalus atrox*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus viridis*, *Crotalus horridus atricaudatus*, *Agkistrodon contortrix contortrix*, *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *Lachesis achrocorda* y *Lachesis muta* (Arce *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2014).

A pesar de su paraespecificidad, las diferencias antigénicas entre venenos de distintas especies hacen que la mayor parte de los venenos heterólogos no sean neutralizados por los antivenenos. Por ejemplo, PoliVal-ICP no neutraliza la actividad letal los venenos de ejemplares costarricenses de *Atropoides mexicanus* y *Bothriechis schlegelii* (Solano *et al.*, 2010); ni los de las cascabeles neurotóxicas (Saravia *et al.*, 2002) esto evaluado con una dosis de reto de 4 DL₅₀, tal como se utiliza para el control de calidad de antivenenos producidos en el ICP.

Una vez que los caballos son hiperinmunizados, se realiza la cosecha de su plasma mediante sangría por punción yugular (León *et al.*, 2011), la cual se realiza con una estricta técnica aséptica y empleando bolsas estériles con anticoagulante. Luego de dejar que la sangre sedimente en refrigeración (2-8°C) el plasma es separado por decantación, preservado por la adición de preservantes, y conservado en refrigeración. Por su parte, los glóbulos rojos son resuspendidos en solución salina para ser transfundidos en el caballo correspondiente.

1.5.3. Producción de antiveneno

Durante la producción de antiveneno no se le puede dar al producto mayor especificidad que la obtenida durante la inmunización. Lo que sí se hace es purificar las inmunoglobulinas, concentrarlas o diluirlas hasta alcanzar una potencia que sea clínicamente eficaz, formularlas con excipientes y estabilizarlas mediante liofilización (León *et al.*, 2011).

La purificación de inmunoglobulinas puede incluir pasos de digestión enzimática para obtener fragmento F(ab')₂ (digestión con pepsina) o fragmentos Fab (digestión con papaína); o puede no incluir pasos de digestión enzimática para producir antivenenos formulados con inmunoglobulinas completas.

Posteriormente, las inmunoglobulinas son purificadas (purificación primaria) empleando diferentes métodos físico-químicos como *salting-out*, precipitación con ácido caprílico (WHO, 2016), o fraccionamiento en sistemas de dos fases acuosas (Vargas *et al.*, 2015). Con frecuencia, la pureza de las inmunoglobulinas obtenidas en la purificación primaria se mejora usando métodos cromatográficos (purificación secundaria).

Una vez purificadas, las inmunoglobulinas son formuladas con diversos excipientes que varían de un fabricante a otro. Por ejemplo, se utilizan preservantes como fenol, electrolitos como el NaCl, osmolitos como el sorbitol y lioprotectores como la sacarosa. Las concentraciones de proteína total en los antivenenos normalmente varían entre 3 y 15 g/dL.

En lugares donde no puede garantizarse la cadena de frío requerido para el transporte y almacenamiento de productos sensibles a la temperatura, se prefiere el uso de

formulaciones liofilizadas de antiveneno. La liofilización de antiveneno se realiza en tres etapas: congelamiento, sublimación (secado primario) y desorción (secado secundario). El congelamiento se realiza a una tasa de 1°C/min hasta llegar a los -40°C. El secado primario ocurre a 100-200 mTorr y se realiza a -15°C con la intención de no superar la temperatura de transición vítrea de la formulación (-13°C para inmunoglobulinas completas). Durante el secado secundario, el producto se expone a temperaturas tan altas como los 30°C, durante 3-4 h, con el fin de reducir el contenido de humedad residual (Herrera *et al.*, 2014).

1.6. El problema de las colecciones privadas de serpientes en Costa Rica y el riesgo de accidentes

En Costa Rica existen colecciones privadas de serpientes que, además de poseer ejemplares autóctonos, también poseen diversas especies de serpientes exóticas (Arias-Ortega *et al.*, 2016), cuyos venenos no necesariamente están incluidos en el espectro de paraespecificidad de PoliVal-ICP, y por lo tanto constituyen un riesgo para quienes las manejan.

Un ejemplo de esto son los numerosos ejemplares de *Crotalus pifanorum* que, siendo originarios de Suramérica, son frecuentemente encontrados en serpentarios costarricenses; y ya han producido envenenamientos que debieron ser atendidos por la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) (Arias-Ortega *et al.*, 2016). Siendo que en la actualidad el antiveneno PoliVal-ICP no neutraliza los venenos de las cascabeles neurotóxicas, se volvió necesario ampliar la paraespecificidad de este antiveneno.

La alternativa más simple para lograr esto es mediante la inclusión de un veneno de cascabel neurotóxico dentro del grupo de venenos empleados como inmunógenos para la

producción de PoliVal-ICP. Sin embargo, debido a que: a) los venenos de serpiente pueden tener efectos supresores de la respuesta por anticuerpos inducida por otros venenos empleados como co-inmunógenos (Arroyo *et al*, 2015; 2017), y b) los venenos de cascabeles neurotóxicos son ricos en un complejo heterodimérico de PLA₂s neurotóxico llamado crotoxina (Calvete *et al*, 2010) el cual ha sido identificado como un potente inmunosupresor (Rangel-Santos *et al*, 2004); la inclusión de este veneno dentro del grupo de inmunógenos merece ser analizado cuidadosamente.

Este trabajo se propuso con el objetivo de caracterizar la composición proteica y las actividades tóxicas del veneno de la serpiente *C. pifanorum*, y evaluar su uso como inmunógeno sobre la respuesta por anticuerpos contra co-inmunógenos y venenos de otros crótalos americanos, y la viabilidad de ampliar la paraespecificidad del antiveneno PoliVal-ICP, sin afectar la capacidad del antiveneno para neutralizar los venenos de las serpientes centroamericanas.

2. JUSTIFICACIÓN

La ampliación de la paraespecificidad del antiveneno poliespecífico producido por el Instituto Clodomiro Picado para cubrir los venenos de cascabeles neurotóxicas es necesaria para garantizar la existencia en el país, de un tratamiento eficaz para los envenenamientos producidos por serpientes suramericanas que, siendo exóticas, son mantenidas en serpentarios privados que operan en el país; por lo que existe el riesgo que ocurran envenenamientos por estos ejemplares para los cuales PoliVal-ICP no sería eficaz.

En el caso de *C. pifanorum*, se presentó el envenenamiento del herpetólogo a cargo de un serpentario ubicado en el Pacífico sur de nuestro país. Esto evidencia la necesidad de contar en el país con un antiveneno que sea eficaz para tratar los envenenamientos que eventualmente estos ejemplares exóticos pudieran producir, además de obtener un suero que pueda utilizarse en casos de envenenamiento por cascabeles neurotóxicas en Suramérica y en otros lugares donde hay desabastecimiento de sueros antiofídicos.

Por otro lado, no existen reportes previos de la composición proteómica del veneno de *C. pifanorum*, por esto nuestro primer objetivo fue caracterizarlo para tener una base del tipo de veneno y de los componentes que influyen en su letalidad y así estudiar el efecto de incluirlo dentro de la mezcla inmunomoduladora para la creación de un antiveneno eficaz contra crótalos neurotóxicos.

La mayor parte de los envenenamientos ofídicos en América se atribuyen a serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus*, seguidos de *Agkistrodon*, *Lachesis* y *Micrurus*. Las especies *C. horridus* y *C. scutulatus* se ubican dentro de las serpientes principales causantes de envenenamientos en Norteamérica, por otro lado, en Centroamérica las serpientes principales involucradas en ofidismo son *C. simus* y *B. asper*

(que además se encuentra en norte y sur América) y en Suramérica y el Caribe (Aruba) se encuentra *C. durissus* (WHO, 2010; 2017). Por dicha razón, escogimos estas especies para estudiar la inmunomodulación del efecto que posee el suero polivalente que se generó incluyendo al suero PoliVal-ICP, el veneno de *C. pifanorum*.

Con esta investigación, se pretendió ampliar el espectro de cobertura del suero antiofídico polivalente generado en el ICP. Como se conoce que especies de serpientes relacionadas conservan algunas similitudes antigénicas en los componentes de sus venenos y así los anticuerpos generados por inmunización con un veneno en particular pueden reaccionar de forma cruzada con algunas toxinas en venenos heterólogos. Se quiere incluir el veneno de la cascabel suramericana, *Crotalus pifanorum* en el sistema de inmunización y evaluar la capacidad neutralizante que posee el suero generado sobre venenos homólogos y heterólogos de cascabeles americanas para así revertir las consecuencias clínicas generadas por el accidente ofídico. Además de estudiar posibles mejoras para el proceso de generación de antiveneno polivalente en el ICP.

3. HIPÓTESIS

El uso del veneno de *C. pifanorum* como inmunógeno en la producción de PoliVal-ICP permite ampliar el espectro de cobertura de este antiveneno para neutralizar el veneno de cascabeles neurotóxicas, sin afectar la respuesta contra los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar proteómica y toxicológicamente el veneno de *C. pifanorum* y evaluar su inclusión en el grupo de venenos empleados como inmunógenos en la producción del antiveneno PoliVal-ICP, para ampliar el espectro de venenos neutralizados por este antiveneno.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1. Caracterizar la composición proteómica del veneno de *C. pifanorum* para compararla con la de los venenos de otras serpientes del género *Crotalus*, cuyas propiedades inmunogénicas e inmunomoduladoras hayan sido reportadas con anterioridad.

5.2. Determinar las actividades tóxicas y enzimáticas inducidas por el veneno de *C. pifanorum* en presencia y ausencia de inhibidores, para correlacionarlas con su composición proteómica e identificar las familias de toxinas responsables de cada una de esas actividades.

5.3. Comparar la capacidad neutralizante de un antiveneno preparado contra los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*, con la de un antiveneno preparado contra esos venenos y además el de *C. pifanorum*, para evaluar el efecto que tiene la inclusión de este último veneno sobre la potencia neutralizante del antiveneno contra todos los venenos homólogos y algunos venenos heterólogos de serpientes del género *Crotalus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Consideraciones éticas

Este proyecto cumplió con los Principios de la Guía Internacional para la Investigación Biomédica que involucra Animales (CIOMS, 1985) y las Guías ARRIVE para el reporte de experimentos *in vivo* (Kilkenny *et al.*, 2010). Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales de experimentación en este estudio fueron sometidos para aprobación por el Comité para el Uso y Cuido de Animales de Laboratorio (CICUA) de la Universidad de Costa Rica. En el acta 82 se aprueba el artículo 6 (Uso de caballos en la producción de antivenenos de origen equino), artículo 8 (Uso de animales de laboratorio en la producción de antivenenos de origen equino) y artículo 9 (Uso de serpientes en la producción de antivenenos de origen equino).

6.2. Materiales biológicos

6.2.1. Veneno

Los venenos de *B. asper*, *C. pifanorum* (Venezuela), *C. simus* y *L. stenophrys* fueron obtenidos de ejemplares adultos mantenidos en cautiverio en el Serpentario del ICP. Estos ejemplares fueron anestesiados con CO₂ para obtener su veneno mediante estimulación mecánica de las glándulas. El veneno fue estabilizado por liofilización y almacenado a -20°C hasta su uso. Los venenos de *C. horridus* y *C. scutulatus* fueron donados por la Dra. Charlotte L. Ownby de Oklahoma State University, USA; y el veneno de *C. d. terrificus* fue donado por el Instituto Butantan de Brasil. Todos los venenos utilizados, se disolvieron previo a su uso en solución de PBS (NaCl 0,14 M y 0,04 M de fosfato, pH 7.2), misma

solución que se utiliza como control en las distintas pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* evaluadas.

6.2.2. Animales de experimentación

Se utilizó un grupo de 34 caballos criollos, de ambos sexos, con peso corporal de 350-450 kg, mantenidos en la caballeriza del ICP y rutinariamente inmunizados con los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*, para la producción del plasma hiperinmune que es usado como material de partida en la manufactura de PoliVal-ICP. Posteriormente, el esquema de inmunización de estos animales fue modificado para incluir el uso del veneno de *C. pifanorum* como inmunógeno y producir el plasma hiperinmune que fue usado como material de partida para la producción de PoliVal-ICP⁺. Durante todo el proceso experimental, los caballos se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, mediante una técnica de pastoreo en potreros sembrados con forraje del tipo Ray-grass, complementada con alimento peletizado enriquecido con proteínas, vitaminas y minerales. Además, se emplearon ratones de ambos sexos (cepa CD-1) con peso entre 18-20 g para realizar las pruebas de actividades tóxicas. Los ratones fueron producidos y mantenidos en el bioterio del ICP. Durante todo el proceso experimental, los ratones se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*.

6.3. Caracterización proteómica del veneno de *C. pifanorum*

6.3.1. Fraccionamiento del veneno

El veneno de *C. pifanorum* se fraccionó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Para esto, primero se preparó una muestra de 5 mg del veneno

de *C. pifanorum* diluida en 200 μ L de un amortiguador polar (amortiguador A) compuesto por 5% acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético (ATF) en agua. La muestra de veneno fue centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante obtenido fue fraccionado empleando un cromatógrafo Agilent 1100 con detector UV de onda variable (Agilent technologies 1100 Series), equipado con una columna Eclipse plus C18 ZORBAX (250 \times 4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula; Agilent). Para la elución de las proteínas, se utilizó un flujo de 1 mL de solvente/min bajo las siguientes condiciones: 5% de la solución B (95% acetonitrilo, 5% H₂O y 0.01% TFA) por 10 min, seguido de 5-15% de la solución B por 20 min, 15-45% B por 120 min, y 45-70% B por 20 min. La detección de proteínas se realizó a una longitud de onda de 215 nm. Las fracciones colectadas se secaron en un evaporador centrífugo y se mantuvieron a -20°C hasta su análisis (Lomonte *et al.*, 2014).

6.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las fracciones colectadas en el RP-HPLC fueron disueltas en agua ultrapura y la concentración de las soluciones resultantes fue determinada a partir de la absorbancia a 280 nm medida con un Nanodrop (Thermo 2000). Posteriormente, muestras de 20 μ g de cada fracción fueron separadas electroforéticamente en geles de acrilamida al 15%, en presencia de SDS (SDS-PAGE), en condiciones reductoras (Laemmli, 1970). En el mismo gel se corrió un marcador de peso molecular (MPM; Precision Plus Protein Standards, BioRad, CA, EU). El gel se tiñó con Azul de Coomassie R-250 y se visualizó en un ChemiDoc (BioRad, CA, EU). La densidad óptica del electroferograma se determinó con el programa Image-J® (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

6.3.3. Análisis de las bandas

Las bandas obtenidas por electroforesis, y las fracciones colectadas directamente del HPLC en las que no se visualizó bandas en el SDS-PAGE, fueron enviadas al laboratorio de Proteómica del ICP para su análisis por espectrometría de masas. Allí, las muestras fueron colocadas en una solución ditiotretitol 10mM para su reducción, seguida de una alquilación con yodoacetamida 50 mM y una digestión en gel con tripsina bovina (grado de secuenciación) a 37°C durante 18 horas. Los péptidos resultantes fueron extraídos con una solución de acetonitrilo 50% y TFA 0,1% y fueron concentrados con un evaporador centrífugo de vacío. Posteriormente, los péptidos concentrados fueron mezclados con un volumen igual de una solución saturada de ácido α -ciano-4hidroxicinámico en TFA 0,1% y acetonitrilo 50% (solución madre); 1 μ L de esta mezcla fue colocada en una placa de MALDI (384 Opti-TOF, Applied Biosystems) y se dejó secar con aire. Las muestras fueron analizadas por MALDI-TOF/TOF usando un espectrómetro de masas (4800-Plus Proteomics Analyzer mass spectrometer; Applied Biosystems). Los espectros de masas fueron analizados empleando la base de datos UniProt para serpientes con el algoritmo Paragon del ProteinPilot v.4. La similitud entre las secuencias obtenidas con las de otras serpientes, fueron evaluadas mediante el programa BLAST (Lomonte *et al.*, 2014). Debido a un problema técnico con el equipo de análisis MALDI, algunas bandas no pudieron ser analizadas. Sin embargo, se estudió la masa intacta de dos fracciones (las más abundantes en el veneno, ver en sección de resultados F4 y F7) por medio de análisis con electrospray utilizando un analizador MS System Q TRAP 3200.

6.3.4. Abundancia relativa de familias proteicas

La abundancia relativa de las familias proteicas se obtuvo mediante la integración del área correspondiente a cada pico en el cromatograma con el programa ChemStation, (Agilent Technologies, CA, EU) y el análisis por densitometría del gel de electroforesis con el programa ImageLab, (BioRad, CA, EU).

6.4. Actividades tóxicas y enzimáticas de los venenos

6.4.1. Determinación de la letalidad

La letalidad de los venenos fue evaluada empleando la vía *i.p.* en ratones a los cuales se les inyectó 500 μ L de veneno en varias dosis a evaluar, empleando cinco ratones por nivel. Luego, las muertes ocurridas en las 48 h posteriores a la inyección fueron registradas. La dosis letal media (DL₅₀; la dosis de veneno en la que mueren la mitad de los ratones inyectados), así como los límites de confianza al 95%, fueron calculados mediante el procedimiento de Spearman-Kärber, (WHO, 1981).

6.4.2. Determinación de la actividad fosfolipasa

Se siguió la metodología descrita por Dole (1956), en la cual se utilizó un sustrato preparado con yema de huevo como fuente de fosfolípidos, diluido en 160 mL de solución de Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM y Tritón 100 X con pH 8.5. En tubos de ensayo grandes se colocó 1 mL del sustrato y se incubó a 37°C durante 1 minuto. Luego se agregó 100 μ L de cada dosis de veneno a evaluar por triplicado y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente se agregaron 5 mL de mezcla de extracción (120 mL de isopropanol, 30 mL de N- heptano y 3 mL de ácido sulfúrico 1N) y se incubó durante 10 minutos a TA. Luego

se agregaron 3 mL de agua y 2 mL de heptano. De esta mezcla se transfirieron 2 mL del sobrenadante a un tubo de ensayo nuevo, para mezclarlos con 1mL de la mezcla de titulación (90 mL de etanol 95% con 10 mL de azul de timol 0.1%). Los ácidos grasos liberados por la acción del veneno fueron titulados con NaOH 0.018N. La actividad fosfolipasa fue expresada como el promedio \pm DE de los μ Eq de ácidos grasos liberados por mg de veneno por minuto (μ Eq/mg/min).

6.4.3. Determinación de la actividad miotóxica

Grupos de tres ratones fueron inyectados *i.m.* en el gastrocnemio derecho con 50 μ L de PBS conteniendo diferentes cantidades de veneno a evaluar. Tres horas después, muestras de sangre fueron recolectadas de la cola de cada ratón, empleando capilares heparinizados (Gutiérrez *et al.*, 1980). La actividad creatina kinasa (CK) se determinó mediante un kit comercial (CK-NAC Unitest; Wiener, St Ingbert, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la dosis miotóxica mínima (DMM), como la cantidad de veneno que indujo un incremento de la actividad plasmática de CK, correspondiente a cuatro veces la actividad de ratones inyectados con PBS (grupo control). La actividad se expresó como el promedio \pm desviación estándar en U/L.

6.4.4. Determinación de la actividad Coagulante

Se siguió la metodología propuesta por Theakston y Reid (1983). Brevemente, 200 μ L de plasma humano citratado, atemperado a 37°C, fueron mezclados con 100 μ L de PBS conteniendo diferentes cantidades de veneno a evaluar por triplicado. Posteriormente, el tiempo que tardó el plasma en coagularse fue cronometrado. La dosis coagulante mínima

(DCM), fue definida como la cantidad de veneno que indujo la coagulación del plasma en 60 segundos.

6.4.5. Determinación de la actividad desfibrinogenante

Se determinó según el protocolo descrito por Theakston y Reid (1983), modificado por Gené *et al.*, (1989). Para esto, grupos de tres ratones fueron inyectados *i.v.* por la vena caudal, con 200 μ L de PBS conteniendo distintas dosis de veneno a evaluar. Una hora después de la inyección, los ratones fueron anestesiados con éter etílico y muestras de sangre fueron colectadas del plexo orbital. Inmediatamente, las muestras fueron colocadas en tubos de vidrio y mantenidas a TA durante 2 h, al cabo de las cuales fueron examinadas para determinar si coagularon o no. La dosis desfibrinogenante mínima (DDM) fue determinada como la dosis más baja de veneno donde la sangre de todos los ratones del grupo permaneció sin coagular.

6.4.6. Determinación de la actividad proteinasa

Se utilizó el método descrito por Gutiérrez *et al.*, (2008), con modificaciones mínimas. En placas de 96 hoyos se agregaron 100 μ L de sustrato de azocaseína (10 mg/mL) disuelta en PBS y se incubaron durante 90 min a 37°C con 20 μ L de soluciones de veneno de diferentes concentraciones a evaluar por triplicado. Luego se detuvo la reacción con 200 μ L de ácido tricloroacético 5% v/v y la placa fue centrifugada. Del sobrenadante se tomaron 150 μ L y se transfirieron a un pozo nuevo de la microplaca y se mezclaron con 150 μ L NaOH 0.5 M. Por último, se determinó la absorbancia de las mezclas a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas Multiskan FC (Thermo Scientific). Las unidades de

actividad proteinasa se calcularon como la cantidad de veneno requerida para producir un cambio de 0,2 de la absorbancia por minuto.

6.4.7. Determinación de la actividad hemorrágica

Se siguió la metodología de Kondo modificada por Gutiérrez *et al*, (1985) y Jenkins *et al*, (2017). Brevemente, grupos de tres ratones fueron inyectados por vía *i.d.* (en la región ventral) con 100 μ L de diferentes soluciones de veneno en varias concentraciones a evaluar. Dos horas después de la inyección de veneno, los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO₂ para medir el diámetro de la lesión hemorrágica en la cara interna de la piel. Esto se realizó mediante el análisis de una imagen de la lesión hemorrágica con el programa Inkscape 0.91 (<https://inkscape.org/download/>), para determinar el área y la intensidad de la lesión hemorrágica producida por el veneno y expresarla en unidades de hemorragia (HaU). Se consideró que una dosis hemorrágica mínima (DHM) es la cantidad de veneno que genera 50 HaU.

6.5. Inhibición del veneno de *C. pifanorum*

Se utilizaron los siguientes inhibidores: Batimastat (2R,3S-N4-Hidroxi-N1[(1S)-2-(metilamino)-2-oxo-1-(fenilmetil)etil]-2-(2-metilpropilo)-3-[(2-tienilthio) metil] butane diamida) como inhibidor de metaloproteasas; bromuro de *p*-bromofenacilo como inhibidor de fosfolipasas y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) como inhibidor de serinoproteasas. El Batimastat se disolvió en PBS conteniendo 0,01% de Tween 80, mientras que los otros dos inhibidores se disolvieron en etanol al 99%. Se utilizaron como

controles: PBS, veneno sin inhibir y etanol 99% en el caso del *p*-BPB y el PMSF (utilizado para disolverlos).

6.5.1. Inhibición de PLA₂s con bromuro de *p*-bromofenacilo (*p*-BPB)

Se utilizó la metodología descrita por Díaz-Oreiro y Gutiérrez (1997). Para esto, se prepararon soluciones de veneno de 3 mg/mL diluidas en PBS. Se preparó una solución de *p*-BPB 3 mg/mL. Luego se mezcló 1 mL del veneno con 0.15 mL de *p*-BPB hasta obtener concentraciones finales de 2,61 mg/mL y 0.40 mg/mL respectivamente. Las mezclas se incubaron 24 horas a TA. La preparación de veneno fue diluida según lo requerido por el ensayo en el que el veneno fue estudiado.

6.5.2. Inhibición de SVSPs con fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF)

Se prepararon soluciones de veneno de 3 mg/mL diluidas en PBS y una solución de PMSF 3 mg/mL. Luego se mezcló 1 mL del veneno con 0.15 mL de PMSF hasta obtener concentraciones finales de 2,61 mg/mL y 0.40 mg/mL respectivamente. Las mezclas fueron incubadas por 24 horas a TA. La preparación de veneno fue diluida según lo requerido por el ensayo en el que el veneno fue estudiado.

6.5.3. Inhibición de SVMPS con Batimastat

Se utilizó la metodología descrita por Rucavado *et al* (2000). Para esto, se prepararon soluciones de veneno de 4 mg/mL disueltas en PBS con 0,01% de Tween 80. Se utilizó Batimastat 200 μ M en pruebas *in vivo* y 80 μ M en pruebas *in vitro* respectivamente. Luego se mezclaron partes iguales de la solución de veneno y de la suspensión de

Batimastat, hasta obtener concentraciones finales de 2 mg/mL y 100 μ M o 40 μ M respectivamente. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 30 minutos. La preparación de veneno fue diluida según lo requerido por el ensayo en el que el veneno fue estudiado.

6.6. Producción de antivenenos

El antiveneno PoliVal-ICP⁺ (lote 5780716 POLQ) fue producido a partir de una mezcla de plasmas de 34 caballos previamente inmunizados con los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys* a los cuales posteriormente se les sumó el veneno de *C. pifanorum*. Las inmunoglobulinas de este plasma fueron purificadas mediante la técnica de precipitación con ácido caprílico, formuladas a una concentración de proteína total de aproximadamente 5.0 g/dL, pH 7.4, NaCl 0.85% y fenol 0.25%. La formulación final fue esterilizada por microfiltración con una membrana de 0.22 μ m, envasada en viales de borosilicato de 10 mL, estabilizada por liofilización y almacenada en refrigeración (2-8°C) hasta su uso. El antiveneno PoliVal-ICP (lote 607-0618 POLQ) fue producido de forma similar, pero empleando muestras de plasma de los mismos caballos antes de ser inmunizados con el veneno de *C. pifanorum*.

6.7. Capacidad neutralizante de los antivenenos

La capacidad neutralizante de los antivenenos fue determinada mezclando una cantidad constante de veneno (dosis de reto) nativo con diferentes diluciones del antiveneno (PoliVal-ICP o PoliVal-ICP⁺). Las mezclas fueron incubadas a 37°C por 30 min antes de ser sometidas a los análisis de actividades enzimáticas y tóxicas descritos anteriormente. Mezclas de veneno con PBS en lugar de antiveneno fueron usadas como control. Para la

neutralización de la actividad letal, se utilizó una dosis de reto de 4 DL₅₀s y se determinó la DE₅₀, expresada como la razón μL antiveneno/mg veneno en la que sobrevive el 50% de la población de ratones inyectados. La dosis de reto para la actividad PLA₂ fue de 12,5 μg de veneno. Para la actividad miotóxica la dosis de reto fue de 25 μg de los venenos de *B. asper*, *C. simus*, *L. stenophrys* y *C. horridus*; y 5 μg de los venenos de *C. pifanorum*, *C. scutulatus* y *C. d. terrificus*. Para las actividades coagulante y desfibrinogenante, las dosis de reto usadas fueron 2 DCM y 2 DDM, respectivamente. Para la actividad proteinasa se utilizó como dosis de reto 3 μg de veneno, y para la actividad hemorrágica se utilizó 10 DHM. Se utilizó PBS como control negativo y veneno sin antiveneno como control positivo.

6.8. Análisis de datos y estadística

El cálculo de la actividad letal y su respectiva neutralización se obtuvo mediante el procedimiento de Spearman-Kärber, así como sus límites de confianza al 95% mediante el programa Probit (Finney, 1971).

El cálculo de cada actividad tóxica/enzimática y sus neutralizaciones, con sus respectivas desviaciones estándar, se realizó mediante la creación de una ecuación lineal utilizando el programa de Windows, Microsoft Excel. Para el análisis estadístico de las actividades, primero se evaluó la naturaleza de los datos, según criterios de normalidad (pruebas de Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (pruebas de Levene).

En la caracterización del veneno nativo de *C. pifanorum*, se realizaron pruebas *t* de student para comparar las medias entre el veneno nativo y el inhibidor para cada actividad, en casos donde se probaron varios inhibidores en una misma actividad, se realizaron

pruebas ANOVA de comparaciones múltiples y luego se analizó cual inhibidor presentaba diferencia significativa respecto al veneno nativo por medio de análisis Pos-hoc de tipo Tukey. Se consideraron diferencias significativas con valores de $p < 0,001$.

Por otro lado, para conocer si se presenta diferencias entre los dos antivenenos evaluados en cada actividad tanto para venenos homólogos como heterólogos, se realizaron pruebas t de student y se consideró diferencias significativas con valores de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de la composición proteómica del veneno de *C. pifanorum*.

En el perfil de RP-HPLC del veneno de *C. pifanorum* (figura 2) pueden observarse 13 fracciones (13 picos). Estas, fueron numeradas según su orden de elución. El análisis por SDS-PAGE (figura 3) evidenció la ausencia de componentes capaces de producir bandas visibles en las fracciones F1, F2, F3, F5 y F6. En el resto de las fracciones sí se observó la presencia de bandas.

Las bandas del gel fueron identificadas con letras para posteriormente ser recortadas del gel y enviadas al laboratorio de proteómica del ICP para su identificación por espectrometría de masas. En el caso de las fracciones F1, F2, F3, F5 y F6, lo que se envió para identificación fue el material eluido de la cromatografía de fase reversa secado en un evaporador centrífugo.

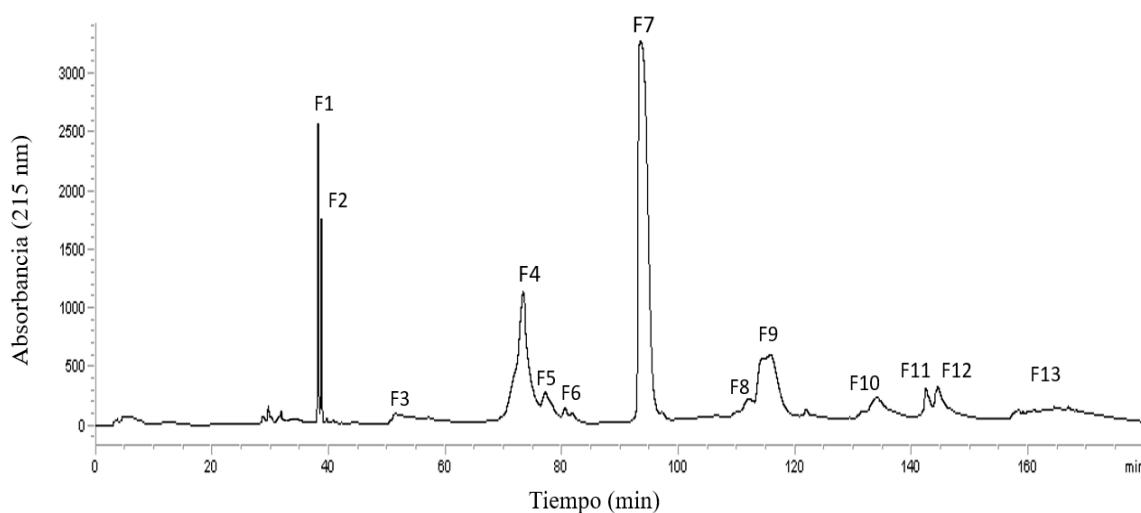


Figura 2: Cromatograma del veneno de *C. pifanorum* fraccionado por RP-HPLC. Las letras "F" con números corresponden a las fracciones colectadas.

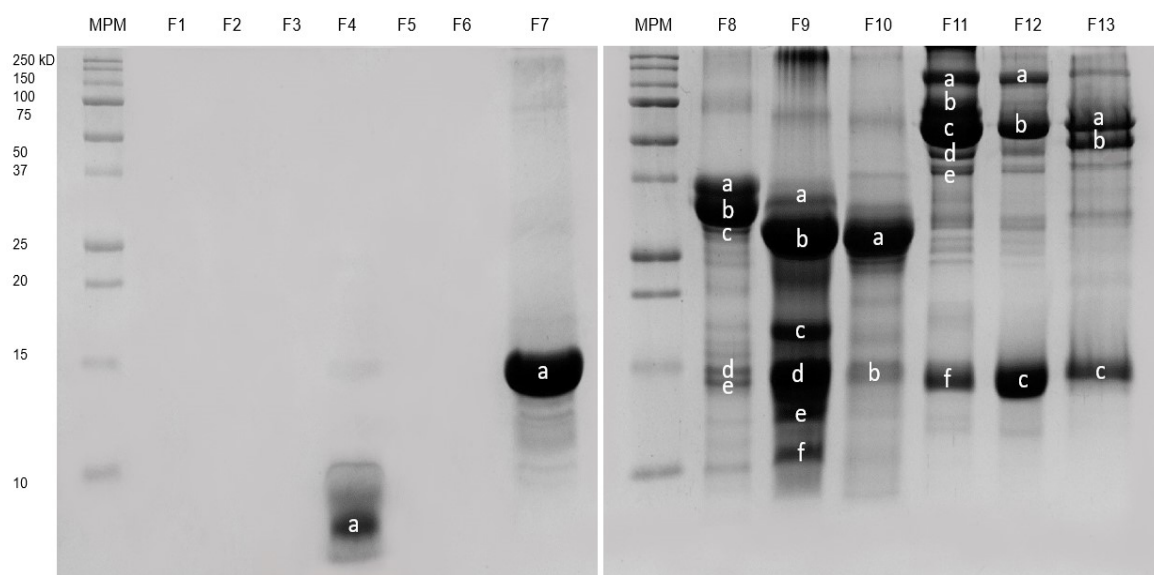


Figura 3: SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas del veneno de *C. pifanorum*. Las letras "F" con números corresponden a las fracciones colectadas y las letras en los carriles corresponden a las bandas escindidas del gel en cada fracción. El MPM, indica el marcador de peso molecular de amplio rango utilizado.

El cuadro 1 contiene el análisis por espectrometría de masas de los componentes del veneno de *C. pifanorum*. Se encontró que las fracciones F1 y F2 contienen una mezcla de tripéptidos inhibitorios de metaloproteasas y péptidos potenciadores de bradiquinina. En las fracciones F3 y F5 solo se encontraron péptidos potenciadores de bradiquinina.

Cuadro 1: Identificación por espectrometría de masas de las bandas obtenidas por SDS-PAGE o muestras líquidas de las fracciones colectadas por HPLC del veneno de *C. pifanorum*. Se presentan los porcentajes de abundancia relativa en el veneno completo, la m/Z, los péptidos derivados para cada banda analizada y la familia proteica a la que pertenecen.

Banda del gel	% abundancia relativa en veneno completo	Iones		Péptidos derivados de Espectrometría de Masas	Familia proteica	Código ID
		m/Z	Z			
F1	3.4	413.1	1	ZNW	Tripéptido inhibitorio de SVMPs	NA
		1238.6		ZRWHPQIPP	PPB	P68515
F2	2.2	444.1	1	ZBW	Tripéptido inhibitorio de SVMPs	NA
		931.4		ZRWHPK	PPB	P68515
F3	1	1238.6	1	ZRWHPQIPP	PPB	P68515
F4a	20.3			PENDIENTE	PENDIENTE posible PLA ₂ (tipo Crotoxina subunidad ácida)	PENDIENTE
F5	4.1	1238.6	1	ZRWHPQIPP	PPB	P68515

F6	NA	905.6	1	No identificado	No identificado	No identificado
F7a	40.3			PENDIENTE	PENDIENTE posible PLA ₂ (tipo Crotoxina subunidad básica)	PENDIENTE
F8a	0.7	1395.6	1	AAYPEYGLPATSR	SVSP (tipo Caliceína)	T1E7K6
		890.5	1	IHLGVHSK		
F8b	3	1395.6	1	AAYPEYGLPATSR	SVSP (tipo Caliceína)	T1E7K6
		2889.4	1	LDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC	SVSP	T2HPV4
F8c	0.8	2142.0	1	LDDAVCQPPYPPELPATSR	SVSP	T1DH10
		2889.4	1	LDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC		
		1395.6	1	AAYPEYGLPATSR	SVSP (tipo Caliceína)	T1E7K6
F8d	0.2	1762.8	1	QFPAENCREEPEPC	PLA ₂ (ácida)	C9E7C4
F8e	NA			No identificado	No identificado	No identificado
F9a	0.2	2294.0	1	AAYPWNPTSTTL CAGSQGGK	SVSP	A0A0U2UH64
		1488.6	1	VVGHPNCNINEHR		
		2889.4	1	LDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC		
		1395.6	1	AAYPEYGLPATSR	SVSP (tipo Caliceína)	T1E7K6
F9b	1.2	3359.4	1	DTCGADSGGPLCNGQFGIVSWGHPGQAR	SVSP	A0A0U2UH64
		2294.0	1	AAYPWNPTSTTL CAGSQGGK		
		1488.7	1	VVGHPNCNINEHR		
		3681.8	1	IMGWGTISPTKETYPDVPHCANINILDHAVCR	SVSP	T1E3B5
		2494.1	1	ETYPDVPHCANINILDHAVCR		
		2889.4	1	LDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC		
		2142.0	1	LLDDAVCQPPYPPELPATSR	SVSP	T1DH10
		1395.6	1	AAYPEYGLPATSR	SVSP (tipo Caliceína)	T1E7K6
F9c	0.1	2294.0	1	AAYPWNPTSTTL CAGSQGGK	SVSP	A0A0U2UH64
		2889.4	1	LDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC		
		1745.6	1	QFPAENCREEPEPC	PLA ₂ (ácida)	C9E7C4
		1762.7	1	QFPAENCREEPEPC		
		2142.0	1	LLDDAVCQPPYPPELPATSR	SVSP	T1DH10
F9d	0.2			PENDIENTE	PENDIENTE	PENDIENTE
F9e	0.3	1762.6	1	QFPAENCREEPEPC	PLA ₂ (ácida)	C9E7C4
		2081.8	1	YRQFPAENCREEPEPC		
		2142.0	1	LLDDAVCQPPYPPELPATSR	SVSP	T1DH10
		1395.6	1	AAYPEYGLPATSR	SVSP (tipo Caliceína)	T1E7K6
F9f	0.1	1505.5	1	CCFVHDCCYGGK	PLA ₂ (ácida)	C9E7C4
F10a	6.7	1747.8	1	ILCAGVLEGGIDTCNR	SVSP	A0A193CHI5
		2318.1	1	NNEHIAPLSLPSSPPSVGVC		
		1136.5	1	SVQFDKEQR		
		1512.6	1	VIGGDECNINEHR	SVSP (tipo Caliceína)	T1E7I9
F10b	0.4	2081.7	1	YRQFPAENCREEPEPC	PLA ₂ (ácida)	C9E7C4
F11a	0.3	1563.7	1	CSSITELEKVNQR	Fosfodiesterasa	T1DJT5
		2332.1	1	EQSSPLSCFPGPVSPDVSGCK		
F11b	0.1	1580.7	1	DLHPELSEDEIKR	Hialuronidasa	T1D6Q3
		1472.7	1	VIEIQNDRETK	LAAO	K9N7B7
F11c	2.4	1870.8	1	NNPGILEYPVKPSEEGK	LAAO	K9N7B7
		1472.7	1	VIEIQNDRETK		
		970.4	1	VQVHFNAR		
		1580.7	1	DLHPELSEDEIKR	Hialuronidasa	T1D6Q3
F11d	0.1	970.4	1	VQVHFNAR	LAAO	K9N7B7
		1580.7	1	DLHPELSEDEIKR	Hialuronidasa	T1D6Q3
F11e	0.1	970.4	1	VQVHFNAR	LAAO	K9N7B7
F11f	0.4			PENDIENTE	PENDIENTE	PENDIENTE
F12a	0.6	1563.7	1	CSSITELEKVNQR	Fosfodiesterasa	T1DJT5
		2332.1	1	EQSSPLSCFPGPVSPDVSGCK		

F12b	2.3	1870.9	1	NNPGILEYPVKPSEEGK	LAAO	K9N7B7
		1472.7	1	VIEIQNDRETK		
F12c	4.5			PENDIENTE	PENDIENTE	PENDIENTE
F13a	1.4			PENDIENTE	PENDIENTE	PENDIENTE
F13b	1.4	1155.4	1	EGNHGYCR	SVMP (tipo desintegrina crotastatina)	Q076D1
		1299.5	1	STECTDRFQR		
F13c	1.2			PENDIENTE	PENDIENTE	PENDIENTE

NA: No asignada.

Por otro lado, las muestras F6 y F8e no se pudieron identificar porque no se derivaron péptidos adecuadamente. Además, debido a un problema técnico con los equipos de espectrometría de masas del ICP, no se pudo completar el análisis y la identificación de los componentes presentes en las fracciones F4a, F7a, F9d, F11f, F12b, F13a y F13c, aún está pendiente y se adjuntará a la posterior publicación del trabajo.

De todas las fracciones pendientes de ser analizadas por espectrometría de masas, la fracción F7a supone un problema especial, debido a que corresponde al 40% de la proteína en el veneno. Por eso, su masa intacta fue analizada por electrospray, obteniéndose una masa de 14256.8 Da (figura 4), la cual coincide con el peso molecular obtenido por SDS-PAGE (figura 3).

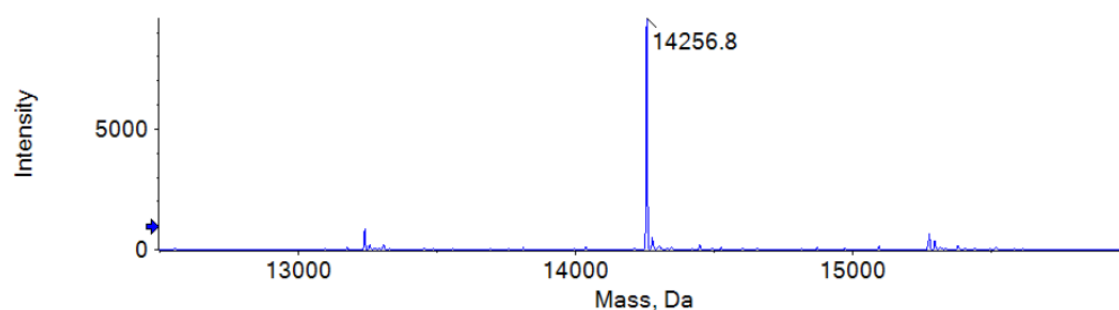


Figura 4: Masa intacta de la fracción F7a por analizador electrospray.

La información anterior, en conjunto con la ubicación del pico F7a en el cromatograma del veneno de *C. pifanorum*, y su comparación con los cromatogramas de

RP-HPLC de venenos de otras especies del género *Crotalus*, sugiere que el componente principal de esta fracción es una PLA₂; la subunidad básica de la crotoxina.

La abundancia relativa de cada una de las fracciones, obtenida por medio de la integración del cromatograma del RP-HPLC, junto con la abundancia relativa de las bandas obtenidas por densitometría del SDS-PAGE, fueron usadas para calcular la abundancia relativa total de cada familia proteica que compone el veneno *C. pifanorum* (figura 5).

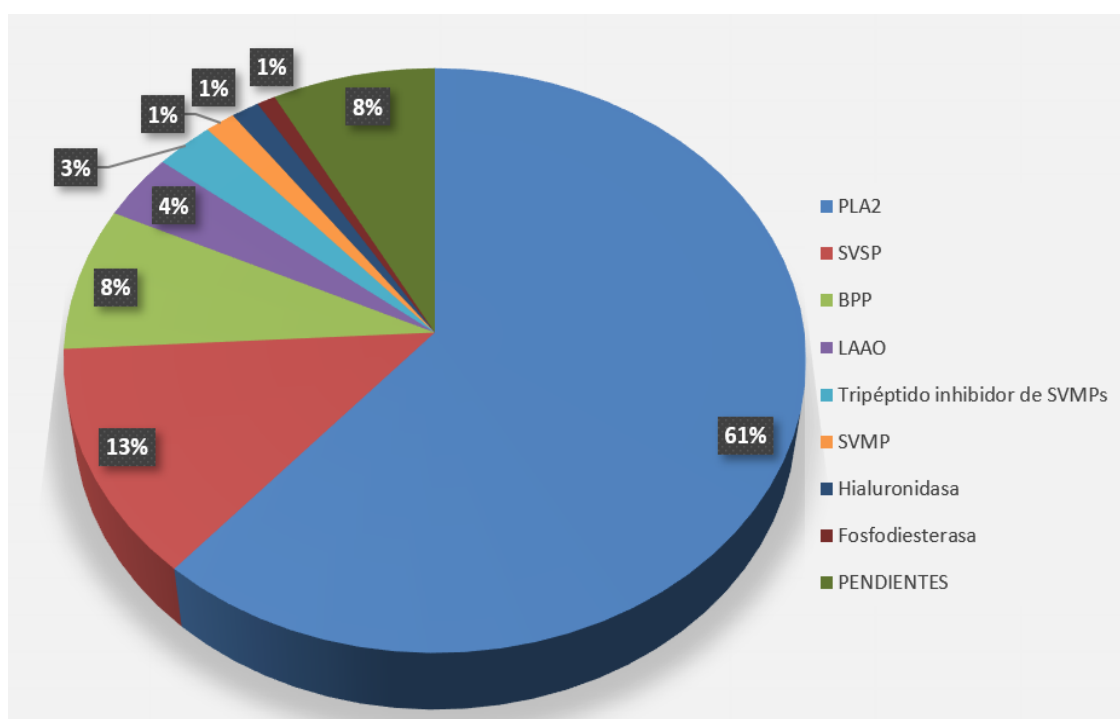


Figura 5: Abundancia relativa de las principales familias proteicas del veneno de *C. pifanorum* identificadas por espectrometría de masas a partir de bandas de proteínas digeridas en gel.

El veneno de *C. pifanorum* está compuesto por 61% de PLA₂s (incluyendo a la crotoxina), 13% de SVSPs (incluyendo un homólogo de calicreína), 8% de PPBs, 4% de LAAOs, 3% de tripéptidos inhibidores de metaloproteasas, 1% de SVMP, 1% de hialuronidasas y 1% de fosfodiesterasas. Por otro lado, como se mencionó anteriormente,

un 8% del veneno está pendiente de identificar, lo que podría resultar en un porcentaje mayor de los representantes de algunas familias proteicas o bien alguna representación dentro de una familia no mencionada hasta el momento en este análisis.

7.2. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *C. pifanorum*

Coincidentemente con su alto contenido de PLA₂s, el veneno nativo (sin inhibidores) de *C. pifanorum* presenta actividad letal con signos de neurotoxicidad, actividad PLA₂ y actividad miotóxica (cuadro 2). Además, en concordancia con su contenido de SVSPs, este veneno presenta actividad coagulante y actividad desfibrinogenante (cuadro 2). El análisis de hemorragia tuvo la limitación de que no se pudo usar dosis altas de veneno porque aún en dosis bajas, los ratones morían antes de mostrar lesiones hemorrágicas. Consecuentemente, no se detectó actividad hemorrágica. Sin embargo, este resultado es coherente con el bajo contenido de SVMPS en el veneno (cuadro 1) y la ausencia de actividad proteolítica (cuadro 2).

La inhibición de PLA₂s con *p*-BPB produjo, respecto al veneno de *C. pifanorum* nativo, una disminución de la actividad PLA₂ *in vitro*, y de la actividad miotóxica en ratones ($t= 2.432$; $gl= 4$; $p= 0.001$). Además, produjo una tendencia a reducir la letalidad del veneno; aunque esta tendencia no llegó a ser significativa (cuadro 2), evidenció el aporte de las PLA₂s en la letalidad producida por el veneno de *C. pifanorum*.

Por otro lado, la inhibición de SVSPs con PMSF produjo una reducción estadísticamente significativa de la actividad coagulante ($F= 114379.905$; $gl= 3$; $p= 0.001$), y de la desfibrinogenante (cuadro 2). Además de una tendencia a reducir la letalidad del veneno, que no llegó a ser significativa (cuadro 2). Finalmente, la inhibición de SVMPS con

Batimastat no afectó la actividad letal del veneno de *C. pifanorum*, indicando que la contribución de las SVMs a esta actividad es despreciable.

Cuadro 2: Actividades enzimáticas y tóxicas del veneno de *C. pifanorum*.

Actividad	Veneno de <i>C. pifanorum</i>			
	Nativo	Inhibido con Batimastat	Inhibido con <i>p</i> -BPB	Inhibido con PMSF
Letalidad ^a	1.6 (1.0-2.9)	1.1 (0.7-1.6)	3.3 (1.4-4.4)	2.7 (2.0-3.5)
PLA ₂ ^b	4.2 ± 1.7	ND	1.7 ± 1.1	ND
Miotóxica ^c	1297 ± 137	ND	426 ± 65*	ND
Coagulante ^d	6.4 ± 0.9	6.6 ± 0.9	6.4 ± 0.2	195.4 ± 0.4*
Desfibrinogenante ^e	1	ND	4	> 8
Proteolítica ^f	0.02 ± 0.01	ND	ND	ND
Hemorrágica ^g	> 8	ND	ND	ND

^a Letalidad mostrada como LD₅₀ y IC del 95%, expresada como µg veneno/ratón.

^b Actividad PLA₂ expresada como µEq de ácidos grasos/mg de veneno/min.

^c Actividad miotóxica expresada como unidades U/L.

^d Actividad coagulante presentada como DCM expresada como µg de veneno.

^e Actividad desfibrinogenante presentada como DDM expresada como µg de veneno.

^f Actividad proteolítica expresada como µg/0.2 UAbs/min.

^g Actividad hemorrágica presentada como DHM expresada como µg de veneno.

ND: No determinada.

* Diferencias significativas ($p < 0.001$) comparadas con el veneno nativo.

7.3. Inmunogenicidad del veneno de *C. pifanorum*

La inmunogenicidad del veneno de *C. pifanorum* fue evaluada mediante la comparación de las capacidades neutralizantes de los antivenenos PoliVal-ICP y PoliVal-ICP⁺ sobre las actividades tóxicas del veneno de *C. pifanorum*. Esta comparación evidenció que el PoliVal-ICP⁺ supera la capacidad el PoliVal-ICP para neutralizar la letalidad y la actividad coagulante ($t= 9.523$; $gl= 4$; $p= 0.001$) del veneno de *C. pifanorum* (cuadro 3). Sin embargo, ambos antivenenos mostraron capacidades similares para neutralizar las actividades PLA₂, miotóxica y desfibrinogenante (cuadro 3).

Cuadro 3: Neutralización* de las actividades del veneno de *C. pifanorum*.

Actividad	Antiveneno	
	PoliVal-ICP	PoliVal-ICP ⁺
Letalidad**	> 3846	1665 (1149-2439)
PLA ₂	2249 ± 131	2061 ± 250
Miotóxica	290 ± 82	189 ± 104
Coagulante**	515 ± 2	440 ± 13
Desfibrinogenante	500	500
Proteolítica	ND	ND
Hemorrágica	ND	ND

*La neutralización de las actividades letal, proteolítica, hemorrágica y PLA₂ es presentada como ED₅₀ expresada como µg de antiveneno/mg veneno. La neutralización de las actividades coagulante y desfibrinogenante es presentada como ED expresada como el radio µL de antiveneno/mg de veneno. La neutralización de la actividad miotóxica es expresada como unidades de CK determinadas en una proporción de 333 µL de antiveneno/mg de veneno.

**Diferencias significativas ($p < 0.05$).

ND: No determinado.

7.4. Efecto del veneno *C. pifanorum* sobre la respuesta contra co-inmunógenos

Las actividades de los venenos usados como co-inmunógenos para la producción del PoliVal-ICP⁺ (*B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*) fueron determinadas con el objeto de poder definir las dosis de reto en los experimentos de neutralización (cuadro 4). Las diferencias en la capacidad los antivenenos PoliVal-ICP y PoliVal-ICP⁺ para neutralizar estos venenos fue atribuida al uso del veneno de *C. pifanorum* como inmunógeno.

Se encontró que el PoliVal-ICP⁺ superó la capacidad del PoliVal-ICP para neutralizar las actividades PLA₂ ($t= 9.931$; $gl= 4$; $p= 0.001$), coagulante ($t= 24.584$; $gl= 4$; $p= 0.001$) y proteolítica ($t= 4.740$; $gl= 4$; $p= 0.009$) del veneno de *B. asper*. Sin embargo, el PoliVal-ICP fue más eficaz en la neutralización de la actividad hemorrágica ($t= -5.836$; $gl= 4$; $p= 0.004$). Ambos antivenenos mostraron similitud en sus capacidades para neutralizar la letalidad y las actividades miotóxica y desfibrinogenante de este veneno (cuadro 5).

Cuadro 4: Actividades enzimáticas y tóxicas de los co-inmunógenos homólogos.

Actividad	Venenos		
	<i>B. asper</i>	<i>C. simus</i>	<i>L. stenophrys</i>
Letalidad ^a	62.2 (46.9-96.6)	10.4 (7.6-17.3)	119.5 (85.1-163.8)
PLA ₂ ^b	14.9 ± 0.8	17.8 ± 0.8	22.1 ± 0.8
Miotóxica ^c	735 ± 234	890 ± 104	448 ± 124
Coagulante ^d	0.2 ± 0.2	41.1 ± 1.8	10.8 ± 0.2
Desfibrinogenante ^e	3	2	6
Proteolítica ^f	1.43 ± 0.38	1.35 ± 0.35	2.02 ± 0.22
Hemorrágica ^g	3.19 ± 0.39	4.05 ± 0.74	3.34 ± 0.42

^a Letalidad mostrada como LD₅₀ y IC del 95%, expresada como µg veneno/ratón.

^b Actividad PLA₂ expresada como µEq de ácidos grasos/mg de veneno/min.

^c Actividad miotóxica expresada como unidades U/L.

^d Actividad coagulante presentada como DCM expresada como µg de veneno.

^e Actividad desfibrinogenante presentada como DDM expresada como µg de veneno.

^f Actividad proteolítica expresada como µg/0.2 UAbs/min.

^g Actividad hemorrágica presentada como DHM expresada como µg de veneno.

Por otra parte, el PoliVal-ICP⁺ mostró ser más eficaz en la neutralización de la letalidad y la actividad coagulante ($t= 5.661$; $gl= 4$; $p= 0.005$) del veneno de *C. simus*. Al mismo tiempo, ambos antivenenos mostraron similar capacidad para neutralizar las demás actividades de este veneno (cuadro 5).

Respecto a las actividades del veneno de *L. stenophrys*, el antiveneno PoliVal-ICP⁺ mostró la mejor capacidad para neutralizar la actividad miotóxica ($t= 5.645$; $gl= 4$; $p= 0.005$), pero el PoliVal-ICP fue más eficaz neutralizando las actividades coagulante ($t= -107.4897$ $gl= 4$; $p= 0.001$) y proteolítica ($t= -3.497$; $gl= 4$; $p= 0.025$) de este veneno. Las demás actividades fueron neutralizadas con similar eficacia por ambos antivenenos (cuadro 5).

Cuadro 5: Neutralización* de las actividades de los co-inmunógenos homólogos.

Veneno	Actividad	Antiveneno	
		PoliVal-ICP	PoliVal-ICP ⁺
<i>B. asper</i>	Letalidad	291 (224-388)	244 (170-355)
	PLA ₂ **	3922 ± 68	1638 ± 393
	Miotóxica	550 ± 84	371 ± 159
	Coagulante**	277 ± 13	87 ± 2
	Desfibrinogenante	250	250
	Proteinasa**	492 ± 47	307 ± 26
	Hemorrágica**	26 ± 6	55 ± 6
<i>C. simus</i>	Letalidad**	356 (267-457)	179 (132-232)
	PLA ₂	453 ± 222	486 ± 14
	Miotóxica	836 ± 75	677 ± 325
	Coagulante**	188 ± 10	149 ± 6
	Desfibrinogenante	250	250
	Proteinasa	543 ± 76	499 ± 73
	Hemorrágica	175 ± 80	235 ± 160
<i>L. stenophrys</i>	Letalidad	196 (139-268)	184 (130-260)
	PLA ₂	1172 ± 104	1199 ± 47
	Miotóxica**	437 ± 16	223 ± 64
	Coagulante**	300 ± 3	511 ± 1
	Desfibrinogenante	1000	1000
	Proteinasa**	413 ± 26	477 ± 18
	Hemorrágica	69 ± 15	84 ± 22

*La neutralización de las actividades letal, proteolítica, hemorrágica y PLA₂ es presentada como ED₅₀ expresada como µg de antiveneno/mg veneno. La neutralización de las actividades coagulante y desfibrinogenante es presentada como ED expresada como el radio µL de antiveneno/mg de veneno. La neutralización de la actividad miotóxica es expresada como unidades de CK determinadas en una proporción de 333 µL de antiveneno/mg de veneno.

**Diferencias significativas (p < 0.05).

7.5. Efecto del veneno de *C. pifanorum* sobre la paraespecificidad del PoliVal-ICP

Las actividades de algunos venenos heterólogos de cascabeles neurotóxicas (*C. horridus*, *C. scutulatus* y *C. d. terrificus*) fueron determinadas con el objeto de poder definir las dosis de reto en los experimentos de neutralización (cuadro 6). Las diferencias en la

capacidad de los antivenenos PoliVal-ICP y PoliVal-ICP⁺ para neutralizar estos venenos fue atribuida al uso del veneno de *C. pifanorum* como inmunógeno.

Cuadro 6: Actividades enzimáticas y tóxicas de los venenos heterólogos

Actividad	Veneno		
	<i>C. horridus</i>	<i>C. scutulatus</i>	<i>C. d. terrificus</i>
Letalidad ^a	6.1 (4.7-8.7)	1.0 (0.6-1.5)	0.6 (0.4-0.8)
PLA ₂ ^b	6.5 ± 1.0	5.0 ± 1.0	6.5 ± 1.0
Miotóxica ^c	729 ± 92	1069 ± 106	1216 ± 292
Coagulante ^d	534.6 ± 4.9	> 151.9*	21.8 ± 0.7
Desfibrinogenante ^e	> 8*	> 8*	2
Proteolítica ^f	0.24 ± 0.04	0.34 ± 0.01	0.10 ± 0.04
Hemorrágica ^g	6.93 ± 0.17	> 8*	> 8*

^a Letalidad mostrada como LD₅₀ y IC del 95%, expresada como µg veneno/ratón.

^b Actividad PLA₂ expresada como µEq de ácidos grasos/mg de veneno/min.

^c Actividad miotóxica expresada como unidades U/L.

^d Actividad coagulante presentada como DCM expresada como µg de veneno.

^e Actividad desfibrinogenante presentada como DDM expresada como µg de veneno.

^f Actividad proteolítica expresada como µg/0.2 UAbs/min.

^g Actividad hemorrágica presentada como DHM expresada como µg de veneno.

El efecto neutralizante de los antivenenos PoliVal-ICP y PoliVal-ICP⁺ sobre las actividades tóxicas de los venenos heterólogos al veneno de *C. pifanorum* se compara en el cuadro 7. En el caso del veneno de *C. horridus*, el antiveneno PoliVal-ICP⁺ mostró mayor eficacia para neutralizar la actividad PLA₂ (t= 5.128; gl= 4; p= 0.007), pero el PoliVal-ICP mostró mejor capacidad para neutralizar la actividad hemorrágica (t= -3.181; gl= 4; p= 0.034). Las demás actividades fueron similarmente neutralizadas por ambos antivenenos.

En el caso del veneno de *C. scutulatus*, el antiveneno PoliVal-ICP⁺ fue más eficaz en la neutralización de la letalidad. Sin embargo, ambos venenos fueron similarmente eficaces para neutralizar las actividades PLA₂ y miotóxica (cuadro 7). En el caso del veneno de *C. d.*

terrificus, ambos antivenenos fueron similares en su capacidad para neutralizar las actividades letal, PLA₂, miotóxica y coagulante (cuadro 7).

Cuadro 7: Neutralización* de las actividades de venenos heterólogos

Veneno	Actividad	Antiveneno	
		PoliVal-ICP	PoliVal-ICP ⁺
<i>C. horridus</i>	Letalidad	341 (239-485)	400 (303-555)
	PLA ₂ **	1172 ± 97	652 ± 19
	Miotóxica	268 ± 86	286 ± 70
	Coagulante	ND	ND
	Desfibrinogenante	ND	ND
	Proteinasa	432 ± 69	466 ± 83
	Hemorrágica**	33 ± 5	72 ± 20
<i>C. scutulatus</i>	Letalidad**	3030 (1923-10000)	1250 (909-1665)
	PLA ₂	1085 ± 107	943 ± 36
	Miotóxica	932 ± 79	649 ± 48
	Coagulante	ND	ND
	Desfibrinogenante	ND	ND
	Proteinasa	ND	ND
	Hemorrágica	ND	ND
<i>C.d. terrificus</i>	Letalidad	1923 (1205-3030)	1786 (1428-2500)
	PLA ₂	1012 ± 6	978 ± 60
	Miotóxica	794 ± 202	439 ± 307
	Coagulante	248 ± 18	221 ± 1
	Desfibrinogenante	125	250
	Proteinasa	ND	ND
	Hemorrágica	ND	ND

*La neutralización de las actividades letal, proteolítica, hemorrágica y PLA₂ es presentada como ED₅₀ expresada como µg de antiveneno/mg veneno. La neutralización de las actividades coagulante y desfibrinogenante es presentada como ED expresada como el radio µL de antiveneno/mg de veneno. La neutralización de la actividad miotóxica es expresada como unidades de CK determinadas en una proporción de 333 µL de antiveneno/mg de veneno.

**Diferencias significativas (p < 0.05).

8. DISCUSIÓN

8.1. Caracterización de la composición proteómica del veneno de *C. pifanorum*.

Aunque aún falta por identificar el 8% de las proteínas del veneno de *C. pifanorum*, nuestros resultados indican que este veneno está compuesto principalmente por PLA₂s (61%; 40% correspondiendo a un homólogo de crotoxina), SVSPs (13%) y PPBs (8%). Otros componentes menos abundantes pertenecen a las familias de las LAAOs (4%), los tripéptidos inhibidores de metaloproteasas (3%), las SVMPS (1%), las hialuronidasas (1%) y las fosfodiesterasas (1%). Esta composición corresponde con lo esperado para un veneno del tipo II de la clasificación de Mackessey (2008).

Otros venenos del tipo II usados en este estudio fueron los de *C. horridus* (58% SVSPs, 32% PLA₂s y 0% SVMPS; Tasoulis y Isbister, 2017), *C. scutulatus* (63% PLA₂s, 31% SVSPs y 0% SVMPS; Massey *et al.*, 2012) y *C. d. terrificus* (48% PLA₂s, 25% SVSPs y 4% SVMPS; Tasoulis y Isbister, 2017). En contraste, el veneno de *C. simus*, tiene una composición que la hace clasificar dentro del tipo I (8% PLA₂s, 5% SVSPs y 72% SVMPS; Lomonte *et al.*, 2014).

8.2. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *C. pifanorum*.

Además de su composición proteica, otro factor que indica que el veneno de *C. pifanorum* corresponde al tipo II de la clasificación de Mackessey es la alta toxicidad de este veneno, en comparación con los demás venenos de cascabel estudiados.

La inhibición del veneno de *C. pifanorum* con *p*-BPB resultó en una tendencia hacia la reducción de la letalidad del veneno. Sin embargo, ese efecto no alcanzó a ser significativo. El *p*-BPB es un inhibidor dirigido al sitio activo de las PLA₂s que inactiva

inespecíficamente la subunidad B de la Crotoxina, mediante la alquilación de su residuo His-48. Sin embargo, este residuo de histidina solo se encuentra disponible para la interacción con el *p*-BPB cuando la subunidad B está dissociada del resto del complejo (Jeng y Fraenkel-Conrat, 1978). Cuando la subunidad B está formando parte de la Crotoxina, la subunidad A (crotapotina) bloquea el ingreso del inhibidor, de modo que el *p*-BPB no es capaz de inhibir completamente la Crotoxina (Sampaio *et al.*, 2010).

Considerando el argumento anterior, es muy probable que del mismo modo en el que los homólogos de crotoxina juegan un papel importante en la letalidad inducida en ratones por los venenos de otras cascabeles como *C. d. terrificus*, *C. basiliscus* y *C. simus* (Segura *et al.*, 2017; Borja *et al.*, 2018), el homólogo de crotoxina encontrado en el veneno de *C. pifanorum* también lo haga.

Además, fue evidenciada una tendencia no significativa de que la inhibición de SVSPs con PMSF también redujera la letalidad del veneno de *C. pifanorum*, lo cual pareciera ser un poco atípico, ya que las SVSPs son conocidas por amplificar el daño producido por las SVMPS, pero no por ser ellas mismas protagonistas en la inducción de letalidad. Por otro lado, la inhibición del veneno de *C. pifanorum* con Batimastat no afectó su letalidad. De este modo, los resultados de los experimentos de inhibición sugieren que la letalidad del veneno de *C. pifanorum* es principalmente debida a su contenido de PLA₂s, pero también a la presencia de SVSPs.

Coincidentemente con su composición, el veneno de *C. pifanorum* mostró evidentes actividades PLA₂s, miotóxica, coagulante y desfibrinogenante, pero no presentó actividad proteolítica o hemorrágica. Según lo esperado, los experimentos de inhibición de las actividades de las diferentes familias de toxinas sugieren que las PLA₂s son las principales

responsables de las actividades PLA₂s y miotóxica; mientras que las SVSPs son las mayores responsables de las actividades coagulante y desfibrinogenante. La baja cantidad de SVMPs en el veneno de *C. pifanorum* es coherente con la baja actividad proteolítica y hemorrágica mostrada por este veneno.

8.3. Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *C. pifanorum*.

Mientras que el PoliVal-ICP fue incapaz de neutralizar la letalidad del veneno de *C. pifanorum*, el PoliVal-ICP⁺ sí lo hizo. Esto sugiere que existen diferencias antigénicas entre los componentes tóxicos del veneno de *C. pifanorum* (PLA₂s y SVSPs) y las toxinas homólogas en los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*. Además, este hallazgo demuestra la capacidad del veneno de *C. pifanorum* para inducir una respuesta por anticuerpos capaz de reconocer a sus componentes letales y neutralizarlos.

Después de comparar al PoliVal-ICP y al PoliVal-ICP⁺ respecto a su capacidad para neutralizar las actividades enzimáticas y tóxicas del veneno de *C. pifanorum*, se encontró que para la capacidad neutralizante de la actividad coagulante fue posible determinar diferencias estadísticamente significativas. Esto sugiere que las principales variaciones antigénicas entre los venenos homólogos del PoliVal-ICP y el veneno de *C. pifanorum* podrían estar concentradas en las SVSPs.

8.4. Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de los co-inmunógenos

Debido a que el veneno de *C. pifanorum* contiene una alta proporción de un homólogo de crotoxina, y que importantes propiedades inmunomoduladoras han sido descritas para este tipo de toxinas (dos Santos *et al.*, 1986; Sampaio *et al.*, 2005), existe el

riesgo de que el uso de este veneno como inmunógeno afecte la respuesta por anticuerpos contra los demás venenos usados como co-inmunógenos (Arroyo *et al.*, 2015).

Después de determinar las actividades enzimáticas y tóxicas de los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*; y comparar la capacidad del PoliVal-ICP y el PoliVal-ICP⁺ para neutralizar esas actividades, fue posible concluir que, contrario a nuestras predicciones, la inclusión del veneno de *C. pifanorum* en el grupo de venenos usados como inmunógenos incrementa la capacidad del antiveneno para neutralizar la actividad letal del veneno de *C. simus*, además de mejorar la neutralización de su actividad coagulante.

En el caso de los venenos de *B. asper* y *L. stenophrys*, el uso del veneno de *C. pifanorum* como co-inmunógeno no afecta la capacidad del antiveneno para neutralizar su actividad letal. Para *B. asper* se mejora la capacidad de neutralización de las actividades fosfolipasa y coagulante, mientras que para *L. stenophrys* se mejora la capacidad para neutralizar su actividad miotóxica. Esto se debe al efecto de la fosfolipasa tipo crotoxina y a las serinoproteasas presentes como componentes principales del veneno de *C. pifanorum*.

8.5. Neutralización cruzada de venenos heterólogos de cascabeles neurotóxicas

Debido a las similitudes antigénicas esperadas entre venenos de serpientes filogenéticamente relacionadas, es de esperar que el PoliVal-ICP⁺ muestre una mejoría de la capacidad neutralizante sobre venenos heterólogos de cascabeles neurotóxicas. Para probar esta hipótesis, las actividades enzimáticas y tóxicas de los venenos de *C. horridus*, *C. scutulatus* y *C. d. terrificus* fueron determinadas y usadas para comparar la capacidad del PoliVal-ICP y el PoliVal-ICP⁺ para neutralizarlas.

Ambos antivenenos mostraron pequeñas diferencias en su capacidad para neutralizar el veneno de *C. horridus*. Mientras que el PoliVal-ICP mostró mayor capacidad para neutralizar la actividad hemorrágica, el PoliVal-ICP⁺ fue más eficaz para neutralizar la actividad PLA₂s. Sin embargo, esas diferencias no tuvieron mayor efecto en la capacidad de ambos antivenenos para neutralizar la letalidad del veneno.

El efecto más importante producido por el veneno de *C. pifanorum* en la paraespecificidad del PoliVal-ICP fue la mejora de la potencia anti-letal contra el veneno de *C. scutulatus*. Interesantemente, esta mejora no fue evidenciada como diferencias en la capacidad de ambos antivenenos para neutralizar las actividades enzimáticas y tóxicas específicas de este veneno.

Previamente, fue reportado que el antiveneno PoliVal-ICP era incapaz de neutralizar el veneno de *C. d. terrificus* (Arce *et al.*, 2003). Sin embargo, después de las modificaciones introducidas a la estrategia de inmunización del ICP para reducir los efectos inmunomoduladores del veneno de *L. stenophrys* (Arroyo *et al.*, 2015), el PoliVal-ICP fue capaz de neutralizar el veneno de *C. d. terrificus*. El uso del veneno de *C. pifanorum* no afectó la capacidad del PoliVal-ICP para neutralizar al veneno de *C. d. terrificus*.

9. CONCLUSIONES

9.1. El veneno de *C. pifanorum* está compuesto principalmente por PLA₂s, SVSPs y BPPs, correspondiendo con un veneno tipo II, según la clasificación de Mackessy. Esta composición es similar a la de otros venenos del tipo II como los de *C. horridus*, *C. scutulatus* y *C. d. terrificus*; a la vez que difiere de la del veneno de adultos de *C. simus*, el cual corresponde al tipo I.

9.2. Acorde con su composición proteica, el veneno de *C. pifanorum* presenta actividad letal dada principalmente por sus PLA₂s y SVSPs, actividades PLA₂ y miotóxica dada por sus PLA₂s, actividades coagulante y desfibrinogenante dada por sus SVSPs, y no presenta actividades proteolítica ni hemorrágica debido a su bajo contenido de SVMPS.

9.3. Al incluir el veneno de *C. pifanorum* en el grupo de inmunógenos, el antiveneno mejoró su capacidad para neutralizar al veneno de *C. simus*, sin afectar su capacidad para neutralizar los venenos de *B. asper* y *L. stenophrys*. Además, amplió su paraespecificidad para incluir al veneno de *C. scutulatus*, pero no alteró su capacidad para neutralizar los venenos de *C. horridus* y *C. d. terrificus*.

9.4. El uso del veneno de *C. pifanorum* como inmunógeno en la producción de PoliVal-ICP permite ampliar el espectro de cobertura de este antiveneno para incluir venenos de cascabeles neurotóxicas, sin afectar negativamente la respuesta contra los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

10.1. Utilizar el conocimiento generado en esta investigación como base para tomar la decisión de modificar el esquema de inmunización de todos los caballos utilizados regularmente en el ICP como fuente en la obtención de inmunoglobulinas y producción de antiveneno polivalente.

10.2. Estudiar la capacidad neutralizante del antiveneno PoliVal-ICP⁺ sobre venenos de otros crótalos del tipo II.

10.3. Ampliar el rango de distribución del antiveneno PoliVal-ICP⁺ hacia países donde no se cuente con suero antiofídico contra el veneno de *C. pifanorum* o el veneno de *C. scutulatus*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angulo, Y., Castro, A., Lomonte, B., Rucavado, A., Fernández, J., Calvete, J., Gutiérrez, J.J., 2014. Isolation and characterization of four medium-size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of the genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. *Biochimie* 107, 376-384.

Arce, V., Rojas, E., Ownby, C. Gutiérrez, J.M., 2003. Preclinical assessment of the ability of polyvalent (*Crotalinae*) and anticoral (*Elapidae*) antivenoms produced in Costa Rica to neutralize the venoms of North American snakes. *Toxicon* 41, 851-860.

Arias-Ortega, J., Bonilla-Murillo, F., Sasa, M., 2016. Desarrollo de la herpetocultura en Costa Rica: Situación actual de herpetarios y manejo *ex situ* de reptiles y anfibios. *Revista de Ciencias Ambientales* 50, 1.

Arroyo, C., Solano, S., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., Vargas, M., Villalta, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2015. *Lachesis stenophrys* venom reduces the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom used as co-immunogen in the production of polyspecific snake antivenom. *Toxicon* 103, 99-105.

Arroyo, C., Solano, S., Segura, A., Herrera, M., Estrada, R., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2017. Cross-reactivity and cross-immunomodulation between venoms of the snakes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* and *Lachesis stenophrys*, and its

effect in the production of polyspecific antivenom for Central America. *Toxicon* 138, 43-48.

Borja, M., Neri-Castro, E., Castañeda-Gaytán, G., Strickland, J., Parkinson, C., Castañeda-Gaytán, J., Ponce-López, R., Lomonte, B., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A., Pérez-Morales, R., 2018. Biological and proteolytic variation in the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins* 10, 35.

Calvete, J., Sanz, L., Cid, P., de la Torre, P., Flores-Díaz, M., dos Santos, M., Borges, A., Breimo, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., 2010. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J. Proteome Res* 9, 528-544.

Calvete, J., 2013. The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon* 62, 40-49.

Campbell, J.A., Lamar, W.W., 1989. The venomous reptiles of Latin America. Comstock Publishing Associates, New York.

Chippaux, J.P., 2017. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 21, 11.

Chunmei, G., Shuqing, L., Yimen, Y., Qiaoqiao, Z., Ming-Zhong, S., 2012. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* 60, 302-311.

CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences). 1985. The international guiding principles for biomedical research involving animals.

Corrales, G., Meidinger, R., Rodríguez, S., Chacón, D., Gómez, A., 2014. Reproduction in captivity of the central American bushmaster (*Lachesis stenophrys*, serpentes: viperidae), in Costa Rica. *Cuad. Herpetol.* 28 (2), 137–139.

Díaz-Oreiro, C., Gutiérrez, J.M., 1997. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35, 241-252.

Dole, V., 1956. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest* 35, 150-154.

Doley, R., Zhou, X. Kini, R.M., 2009. Snake venom phospholipase A₂ enzymes. In: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*; Mackessy, S.P., Ed.; CRC Press: Boca Raton. pp. 173-205.

dos Santos, M.C., D'Imperio-Lima, R., Dias da Silva, W., 1986. Influence of *Crotalus* venom on the response to sheep red blood cells. *Braz J Med Res* 19, 636e636.

Finney, D., 1971. Probits analysis. 3d ed., Cambridge University Press.

Florea, G., Gaz, A., Helemen, H., Muntean, D. 2016. Snake Venom Metalloproteinases. *Acta Medica Marisiensis* 62(1):106-111.

Fry, B., Roelants, K., Champagne, D., Scheib, H., Tyndall, J., King, G., Timo, J., Nevalainen, J., Lewis, R., Raymond, S., Renjifo, C., Rodriguez, R., 2009. The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins in to animal venoms. *Annu. Rev Genomics Hum Genet* 10, 483–451.

Gené, J., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.

Goebel-Stengel, M., Stengel, A., Taché, Y., Reeve Jr., J.R., 2011. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem* 414, 38–46.

Gutiérrez, J.M., 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop.* 50 (2), 377-394.

Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Bolaños, R., 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18, 603-610.

Gutiérrez, J.M., Gené, J., Rojas, G., Cerdas, L., 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 887-893.

Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B. y Angulo Y. 2011. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10, 369-380.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.

Gutiérrez, J.M., Sanz, L., Escolano, J., Fernández, J., Lomonte, B., Angulo, Y., Rucavado, A., Warrell, D., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of heterologous antivenom. *J Proteom Res* 10, 4396-4408.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Sanz, L., Calvete, J., Pla, D., 2014. Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. *J Proteomics* 105, 340-350.

Herrera, M., Tattini, V., Pitombo, R., Gutiérrez, J.M., Borgognoni, C., Vega-Baudrit, J., Solera, F., Cerdas, M., Segura, A., Villalta, M., Vargas, M., León, G., 2014. Freeze-dried snake antivenoms formulated with sorbitol, sucrose or mannitol: Comparison of their stability in an accelerated test. *Toxicon* 90, 54-63.

Hernández-Oliveira S, Hikari M, Oliveira D, Marangoni S, Hyslop S & Rodrigues-Simioni L. 2005. Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of a New PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) Venom. *The Protein Journal*, 24, 4.

Jeng, T., Fraenkel-Conrat, H. 1978. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 600- 604.

Jenkins, T., Sánchez, A., Segura, A., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T., León, G., Gutiérrez, J.M., 2017. An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. *Toxicon* 139, 87-93.

Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A., da Silva, N., Gunawardena, N., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D., da Silva, H., 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 5, 11.

Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I., Emerson, M., Altman, D., 2010. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* (2), 94-99.

Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

León, G., Estrada, R., Chaves, F., Rojas, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., 1999. Inhibition by CaNa_2EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: Application in horse immunization for antivenom production. *Toxicon* 36, 321-331.

León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10, 381-398.

León, G., Segura, Á., Gómez, A., Hernández, A., Navarro, D., Villalta, M., Vargas, M., Herrera, M., Gutiérrez, J.M., 2014. Industrial production and quality control of snake

antivenoms. En: Gopalakrishnakone, P., Calvete, J.J. (Eds.). *Venom Genomics and Proteomics*. Springer, pp. 1-22.

León, G., Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., Solano, G., Gómez, A., Sánchez, M., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 2018. Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon* 151, 63-73.

Lomonte, B., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J., Calvete J., 2014. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *J Proteomics* 105, 323-339.

Loría, G., Rucavado, A., Kamiguti, A., Theakston, R., Fox, J., Alape, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Characterization of basparin A, a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 418, 13–24.

Mackessy S. 2008. Venom composition in rattlesnakes: Trends and biological significance. *The Biology of Rattlesnakes*.

Magro, A.J., Murakami, M.T., Marcussi, S., Soares, A.M., Arni, R.K., Fontes, M.R., 2004. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase

A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem Biophys Res Comm* 323, 24-31.

Markland, F., Swenson, S., 2013. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 62, 3– 18.

Massey, D., Calvete, J., Sánchez, E., Sanz, L., Richards, K., Curtis, R., Boesen, K., 2012. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. *J Proteomics* 75, 2576-2587.

Meier, J., Adler, C., Hösle, P., Cascio, R., 1991. The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms. *Mem Inst. Butan. (Sao Paulo)* 53 (1), 119–126.

Ogawa, T., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Motonori, O., 2005. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon* 45, 1-14.

Olmedo, H., Herrera, M., Rojas, L., Villalta, M., Vargas, M., Leiguez, E., Teixeira, C., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., León, G., Montero, L., 2013. Comparison of the adjuvant activity of aluminum hydroxide and calcium phosphate on the antibody response towards *Bothrops asper* snake venom. *J Immunotoxicol* 11(1), 44-49.

Pérez A. 2013. Descripción de *Crotalus pifanorum*. Manual ofídico.

Phillips, D.J., Swenson, S.D., Markland, F.S., 2009. Thrombin-like snake venom serine proteinases. In: Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles; Mackessy, S.P. Ed.; CRC Press: Boca Raton. pp. 139-154.

Rangel-Santos, A., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., Cardoso, D.F., 2004. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon 44(6), 609-616.

Rucavado, A., Escalante, T., Franceschi, A., Chaves, F., León, G., Cury, Y., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., 2000. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: Effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. Am J Trop Med Hyg 63, 313-319.

Sampaio, S.C., Rangel-Santos, A.C., 2005. Peres, C.M.; Curi, R.; Cury, Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. Toxicon 45(5), 671-676.

Sampaio, S., Hyslop, S., Fontes, M., Prado-Franceschi, J., Zambelli, V., Magro, A., Brigatte, P., Gutierrez, P., Cury, Y., 2010. Crotoxin: Novel activities for a classic B-neurotoxin. Toxicon 55, 1045-1060.

Sandner-Montilla, 1985. Memorias Científicas de ofidiología. Declaración de la Bela Sintra.

Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J.C., Chaves, E., Velásquez, R., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., 2002. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop* 1, 337-346.

Sardar E, Dagda R & Eppie R. 2014. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A₂s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. *J Clin Toxicol*. 4(1): 1000181.

Segura, Á., Herrera, M., Reta-Mares, F., Jaime, C., Sánchez, A., Vargas, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J.M., León, G., 2017. Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*). *J Proteomics* 158, 62-72.

Serrano, S., Maroun, R., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115-1132.

Solano, G., Segura, A., Herrera, M., Gómez, A., Villalta, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2010. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. *Biologicals* 38, 577-585.

Solano, G., Gómez, A., Corrales, G., Chacón, D., Estrada, R., León, G., 2018. Contributions of the snake venoms of *Bothrops asper*, *Crotalus simus* and *Lachesis stenophrys* to the paraspecificity of the Central American polyspecific antivenom (PoliVal-ICP). *Toxicon* 144, 1-6.

Sousa, J.R.F., Monteiro, R.Q., Castro, H.C., Zingali, R.B., 2001. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon* 39, 787–792.

Sunagar, K., Tsai, I., Lomonte, B., Jackson, T., Fry, B., 2015. Group II Phospholipase A₂ Enzymes. *Venomous Reptiles & Their Toxins. Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery. Oxford University Press.* 335-340.

Talha burki. 2018. Resolution on snakebite envenoming adopted at the WHO. *The Lancet* 391(10137):2311.

Tan, N., Saifuddin, N., 1990. Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Toxicon* 28, 385-392.

Tasoulis, T., Isbister, G., 2017. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins* 9, 290.

Theakston, R., Reid, H., 1983 Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, 61, 949-956.

Valverde, J.M., Rodríguez, K., Herrera, M., Segura, Á., Vargas, M., Villalta, M., Montero, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2017. Comparison of the adjuvant activity of emulsions with different physicochemical properties on the antibody response towards the venom of West African carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon* 127, 106-111.

Vargas, M., Segura, Á., Villalta, M., Herrera, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2015. Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two-phase system as a primary purification step. *Biologicals* 43, 37-46.

Wallach, V., Williams, K.L., Boundy, J., 2014. *Snakes of the World: A datalogue of living and extinct species*, CRC Press, Florida.

World Health Organization. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *World Health Organization Publications*, 58.

World Health Organization. 2010. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. World Health Organization.

World Health Organization, 2016. Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization. 2017. Poisonous snake bites. *World Health Organization Publications*.

Yoshida-Kanashiro, E., Navarrete, L.F., Rodriguez-Acosta, A., 2003. On the unusual hemorrhagic and necrotic activities caused by the rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) in a Venezuelan patient. *Rev. Cubana Med. Trop.* 55, 38–40.